

Avaliação da Composição Bioquímica de Pepininhos Silvestres (*Coccinia grandis* (L.) Voigt)

Daniela Cristina Elsenbach

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do
Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar, no âmbito da dupla diplomação
com a Universidade Tecnológica Federal do Paraná*

Orientadores

Professora Doutora Joana Ândrea Soares Amaral

Doutora Ângela Sofia Feitor Fernandes

Professora Doutora Cristiane Canan

Bragança

2023

Este trabalho foi realizado no âmbito do projeto bilateral UTFPR/IPB 01/2019-2020-85 “Avaliação da composição química e atividade biológica de plantas alimentícias não convencionais (PANCs) com vista à sua valorização”.

Dedicatória

*Aos meus pais, Gerson L. Elsenbach
e Loreni T. W. Elsenbach*

“Tenho em mim todos os sonhos do mundo. ”

– Fernando Pessoa

Agradecimentos

Me faltam palavras para expressar toda minha gratidão, mas gostaria de começar agradecendo eternamente aos meus pais, **Gerson Luiz Elsenbach** e **Loreni Terezinha Wickert Elsenbach**, que me incentivaram, apoiaram e estiveram sempre ao meu lado. Sem eles, eu não teria chego até aqui. Agradeço a minha família, meu irmão **Douglas Luiz Elsenbach** e minha cunhada **Franziska Elsenbach**, por estarem sempre por perto e me dar suporte durante os momentos em que estive longe de casa. Sou feliz por tê-los em minha vida.

Agradeço aos meus amigos que estão no Brasil, a **Natália Trevisol** e **Flávia Schwertner**, bem como todos os outros que, mesmo à distância, me apoiaram com mensagens ou pensamentos positivos. Agradeço as minhas amigas da faculdade **Emanuely Graeff**, **Assia Ghattas** e **Taís Campagnaro**, por seu incentivo e apoio durante o processo de inscrição no programa de dupla diplomação.

Agradeço também aos amigos que fiz durante minha estadia em Portugal, aqueles que se tornaram família e compartilharam suas vidas comigo, especialmente ao **Marcelo**, **Nayra**, **Rafaela**, **Lucas**, **Diogo**, **Arnaldo**, **Bruno**, **Mariana**, **Leandro** e **Alex**. E todos aqueles amigos que, embora não tenham sido mencionados, contribuíram para que essa jornada fosse ainda mais especial.

Agradeço às minhas orientadoras do IPB e CIMO **Joana Amaral** e **Ângela Fernandes** e também a minha orientadora da UTFPR **Cristiane Canan**, que se dispuseram a me auxiliar sempre que precisei e por me permitirem aprender muito. Foi uma honra tê-las como orientadoras. Devo muito a todas vocês.

Agradeço a **Lillian Barros** pela sua coordenação excepcional, além de disponibilizar uma estrutura incrível para a realização da pesquisa, assim como agradeço a todos do Centro de Investigação da Montanha (CIMO), que me auxiliaram em análises e compartilharam suas experiências comigo. Agradeço especialmente a **Rossana Cardoso**, **Virginie Xavier**, **Kayane Soares**, **Ângela Liberal**, **Joana Rodrigues**, **Izamara Oliveira**, **Filipa Mandim**, **Tânia Pires**, **Daniele Bobrowski**, **Mikel Ortega**, **Adriana Moliva** e **Mónica Honrado**.

Agradeço acima de tudo a Deus.

Resumo

As plantas são consumidas diariamente e incluídas na dieta da maioria dos seres humanos, tanto nos que optam por refeições vegetarianas, como nos que seguem uma dieta sem restrições alimentares. Porém, existem muitas espécies de plantas que não são consumidas ou que poderiam ser mais valorizadas devido as suas propriedades nutritivas e dos benefícios que aportam para a saúde. Nesse âmbito, emergem as plantas alimentícias não convencionais (PANCs), as quais possuem elevado potencial nutricional, são de fácil acesso e são normalmente encontradas de forma espontânea na natureza.

Na família Curcubitaceae existem várias espécies de plantas que se enquadram como PANC, entre as quais a *Coccinia grandis* (L.) Voigt popularmente designada como pepininho silvestre. Os seus frutos podem ser consumidos *in natura* quando estão verdes ou na forma de geleias e molhos quando se encontram maduros. A sua cor vermelha/alaranjada brilhante evidencia o seu estado de maturação. A maioria dos estudos sobre *C. grandis* relaciona-se com o uso medicinal das suas folhas, raízes e flores, estando descritas propriedades antioxidantes, antimicrobianas, hepatoprotetoras, entre outras. Contudo, os estudos sobre os frutos desta espécie e que poderiam ajudar na valorização e no conhecimento técnico-científico acerca deste fruto são escassos. Assim, o objetivo deste estudo é avaliar a composição nutricional, química e as propriedades biológicas dos frutos imaturos e maduros de *C. grandis* com o intuito de os valorizar como mini-legume e incentivar a sua inclusão na dieta.

Realizaram-se análises da composição centesimal, química e bioativa dos pepininhos silvestres, juntamente com a avaliação do DNA para confirmar a espécie. As análises realizadas nos frutos mostraram que estes possuem elevado teor de hidratos de carbono, apresentando um teor superior de açúcares totais quando estão maduros em relação a frutos verdes. O ácido succínico foi o ácido orgânico maioritário em ambos os estados de maturação. Os pepininhos verdes, por sua vez, contêm maiores quantidades de ácidos gordos insaturados, tornando-os mais benéficos à saúde, além de apresentarem uma maior concentração de α -tocoferol. Os pepininhos maduros (vermelhos) apresentam quantidades relevantes de carotenoides totais.

Foram realizados dois tipos de extração para a avaliação das propriedades bioativas: maceração e extração assistida por ultrassom (EAU). Nenhum dos extratos testados apresentou citotoxicidade, atividade citotóxica ou anti-inflamatória. A produção

de diferentes extratos desempenha um papel crucial na obtenção de uma variedade de compostos bioativos provenientes de matérias-primas. Esses extratos são amplamente utilizados nas indústrias alimentícia, química, farmacêutica e nutracêutica. Essa diversidade de extratos é fundamental para o desenvolvimento de alimentos funcionais e suplementos que visam promover benefícios à saúde e ao bem-estar dos consumidores. Além disso, esses extratos também podem ser empregados como conservantes e corantes em diferentes produtos.

Ambos os estados de maturação e os dois tipos de extração apresentaram atividade antioxidante, e atividade antibacteriana e antifúngica contra as bactérias e fungos testados. Foram identificados 14 ácidos fenólicos e 9 flavonoides glicosídeos, onde se destacaram a quercetina e kaempferol-3-*O*-rutinosídeo. Os perfis de compostos fenólicos foram semelhantes entre os extratos de pepininhos verdes e maduros, sendo os flavonoides detectados em maior quantidade nos pepininhos maduros. A extração assistida por ultrassom apresentou maiores teores de polifenóis comparativamente com a maceração.

Por fim, este estudo permitiu a caracterização e comparação dos frutos da *Coccinia grandis* (L.) Voigt em dois estados de maturação (imaturo e maduro). Os resultados indicam que estes frutos são nutritivos, possuem atividade antioxidante e teores vitamínicos consideráveis. Assim, a realização deste trabalho permitiu apresentar resultados inovadores em relação à caracterização química e às propriedades bioativas deste fruto pouco estudado, e demonstrar que ambas as formas, imaturo e maduro, são aptas para o consumo humano e podem ser incorporadas na alimentação como uma fonte diferente de nutrientes, permitindo diversificar a dieta.

Palavras-chave: PANC, cabaça de hera, valor nutricional, composição química, propriedades bioativas

Abstract

Plants are consumed daily and included in the diets of most human beings, both those who choose vegetarian meals and those who have a diet without dietary restrictions. However, many species of plants are not consumed or could be more highly valued due to their nutritional properties and health benefits. In this context, unconventional food plants (UFP) emerge, which have high nutritional potential, are easily accessible, and are usually found spontaneously in nature.

Within the Cucurbitaceae family, several species of plants qualify as UFP, among them *Coccinia grandis* (L.) Voigt, popularly known as gherkin. Its fruits can be eaten raw when green or in the form of jellies and sauces when mature. The bright red/orange color of the fruit is evidence of its maturation. Most studies on *C. grandis* are related to the medicinal use of its leaves, roots, and flowers, which have been described as having antioxidant, antimicrobial, and hepatoprotective properties, among others. However, studies are scarce on this species fruits, which could contribute to the valorization and technical-scientific knowledge about this little-explored fruit. Thus, this study aims to evaluate the nutritional and chemical composition and the biological properties of immature and mature fruits of *C. grandis* to valorize them as mini-legumes and encourage their inclusion in the diet.

Analyses were performed on the proximate, chemical, and bioactive composition of ivy gourd, along with DNA evaluation to confirm the species. The analyses performed on the fruits showed that they have a high carbohydrate content, with a higher concentration of total sugars observed in mature fruits compared to immature ones. Succinic acid was the major organic acid in both states of maturation. Green cucumbers, on the other hand, contain higher amounts of unsaturated fatty acids, making them more beneficial to health, as well as having a higher concentration of α -tocopherol. Mature (red) cucumbers have significant amounts of total carotenoids.

Two types of extraction were performed for the evaluation of bioactive properties: maceration and ultrasound-assisted extraction (UAE). None of the tested extracts showed cytotoxicity, cytotoxic activity, or anti-inflammatory activity. The production of different extracts plays a crucial role in obtaining a variety of bioactive compounds from raw materials. These extracts are widely used in the food, chemical, pharmaceutical, and nutraceutical industries. This diversity of extracts is essential for the development of functional foods and supplements that aim to promote health benefits and consumer well-

being. Additionally, these extracts can also be employed as preservatives and colorants in various products.

Both states of maturation and both types of extraction demonstrated antioxidant activity, as well as antimicrobial and antifungal activity against the tested bacteria and fungi. Fourteen phenolic acids and nine flavonoid glycosides were identified, with quercetin and kaempferol-3-*O*-rutinoside standing out. The profiles of phenolic compounds were similar between green and ripe gherkins extracts, with a greater extent of flavonoids detected in the ripe gherkins. Ultrasonic-assisted extraction showed higher polyphenol contents compared to maceration.

Finally, this study allowed for the characterization and comparison of *C. grandis* fruits in two states of maturity (immature and mature). The obtained results indicate that these fruits are nutritious, have antioxidant activity, and contain considerable amounts of vitamins. Thus, this work has allowed us to present innovative results regarding this little-studied fruit. It also demonstrates that both forms, immature and mature, are suitable for human consumption and can be incorporated into the diet as a unique source of nutrients, enabling diet diversification.

Keyword: UFP, Ivy gourd, nutritional value, chemical composition, bioactive properties

ÍNDICE

Resumo	VI
Abstract	VIII
Lista de Equações	XII
Lista de Figuras	XIII
Lista de Tabelas	XIV
Lista de Siglas e Abreviaturas	XV
1. Revisão Bibliográfica.....	19
1.1. Plantas Alimentícias Não Convencionais.....	19
1.2. Família Cucurbitaceae	20
1.2.1. <i>Coccinia grandis</i> (L.) Voigt.....	21
1.2.2. Composição centesimal e química	23
1.2.3. Propriedades biológicas.....	26
1.2. Métodos de Extração de Compostos Bioativos.....	29
1.3. Autenticidade da <i>Coccinia grandis</i> (L.) Voigt	30
1.4.1. Análise de DNA	31
1.4.2. Fundamentos da PCR.....	31
2. Objetivos	33
3. Material e Métodos.....	34
3.1. Padrões e Reagentes.....	34
3.1.1. Análise de DNA	34
3.1.2. Análise Química e Nutricional	34
3.1.3. Análise de Propriedades Bioativas	34
3.2. Preparação das Amostras	35
3.3. Análise de DNA	36
3.3.1. Extração do DNA	36
3.3.2. Reação em Cadeia da Polimerase – PCR.....	37
3.4. Caracterização Nutricional e Química	38
3.4.1. Composição Centesimal.....	38

3.4.2. Açúcares Livres.....	38
3.4.3. Ácidos Orgânicos	39
3.4.4. Ácidos Gordos.....	39
3.4.5. Tocoferóis.....	40
3.4.6. Carotenoides Totais.....	41
3.4.7. Compostos Fenólicos	42
3.5. Preparação dos Extratos	42
3.6. Propriedades Bioativas.....	43
3.6.1. Atividade Antioxidante	43
3.6.1.1. Inibição da peroxidação lipídica através de produtos reativos do ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	43
3.6.1.2. OxHLIA – ensaio da inibição da hemólise oxidativa	44
3.6.2. Citotoxicidade	45
3.6.3. Atividade Anti-inflamatória	47
3.6.4. Atividade Antibacteriana e Antifúngica.....	48
3.7. Análise Estatística	49
4. Resultados e Discussão	51
4.1. Avaliação de DNA	51
4.2. Composição Nutricional e Química.....	52
4.3. Propriedades Bioativas.....	69
4.3.1. Atividade Antioxidante	69
4.3.2. Atividade Citotóxica e Anti-Inflamatória	71
4.3.3. Atividade Antibacteriana e Antifúngica.....	73
5. Considerações Finais	79
Referências	82
Trabalhos Publicados	97

Lista de Equações

Equação 1. Hidratos de carbono em g/100 g m.s. 38

Equação 2. Energia total em quilocaloria (kcal/100g m.s.)..... 38

Equação 3. Taxa de inibição em ensaio TBARS..... 44

Equação 4. Percentagem de eritrócitos (PE) no ensaio OxHLIA..... 45

Equação 5. Tempo de atraso da hemólise 45

Lista de Figuras

Figura 1. Taxonomia da família Cucurbitaceae (Fonte: Adaptado de Mukherjee, 2022).	21
Figura 2. Planta <i>Coccinia grandis</i> (Fonte: A- Putra <i>et al.</i> , 2022; B- Kinupp & Lorenzi, 2014).	22
Figura 3. Frutos de <i>Coccinia grandis</i> (imaturo e maduro) (Fonte: globorural.globo.com).	23
Figura 4. Estrutura química do α -tocoferol (Fonte: Carochó & Ferreira, 2013).	24
Figura 5. Estrutura básica da molécula flavonoide (Fonte: Adaptado de Huber & Rodriguez -Amaya, 2008).	27
Figura 6. <i>Coccinia grandis</i> em seus dois estados de maturação imaturo (verde) e maduro (vermelho) (Fonte: Autoria própria).	36
Figura 7. Cromatogramas, obtidos por HPLC-DAD, dos compostos fenólicos de extratos de <i>Coccinia grandis</i> no estado verde de maturação, preparados por EAU e extração convencional (maceração). Os cromatogramas foram processados a 330 nm. A caracterização dos picos é mostrada na Tabela 9.	64
Figura 8. Cromatogramas, obtidos por HPLC-DAD, dos compostos fenólicos de extratos de <i>Coccinia grandis</i> no estado maduro de maturação, preparados por EAU e extração convencional (maceração). Os cromatogramas foram processados a 330 nm. A caracterização dos picos é mostrada na Tabela 9.	64

Lista de Tabelas

Tabela 1. Classificação taxonómica de <i>Coccinia grandis</i> (Fonte: Monalisa <i>et al.</i> , 2014).	22
Tabela 2. Composição centesimal dos frutos de <i>Coccinia grandis</i>	53
Tabela 3. Composição em açúcares livres dos frutos de <i>Coccinia grandis</i>	55
Tabela 4. Composição em ácidos orgânicos dos frutos de <i>Coccinia grandis</i>	56
Tabela 5. Composição em ácidos gordos dos frutos de <i>Coccinia grandis</i>	58
Tabela 6. Composição em tocoferóis dos frutos de <i>Coccinia grandis</i>	60
Tabela 7. Teor de carotenoides totais dos frutos de <i>Coccinia grandis</i>	61
Tabela 8. Teor de carotenoides totais em alimentos fonte de carotenoides (adaptado de Pacheco <i>et al.</i> , 2014).....	62
Tabela 9. Perfil cromatográfico e espectroscópico dos compostos fenólicos dos extratos de <i>Coccinia grandis</i>	66
Tabela 10. Compostos fenólicos individuais, por classes e totais nos extratos de <i>Coccinia grandis</i>	67
Tabela 11. Atividade antioxidante dos frutos de <i>Coccinia grandis</i>	70
Tabela 12. Atividade citotóxica em linhas celulares tumorais e não tumorais dos frutos de <i>Coccinia grandis</i>	72
Tabela 13. Atividade antimicrobiana e antifúngica (CMI,CMB e CMF mg/mL) de extratos hidroetanólicos por maceração dos frutos de <i>Coccinia grandis</i>	75
Tabela 14. Atividade antimicrobiana e antifúngica (CMI, CMB e CMF mg/mL) dos extratos hidroetanólicos assistidos por ultrassom (EAU) de <i>Coccinia grandis</i>	77

Lista de Siglas e Abreviaturas

~	Próximo a
>	Maior que
Δt	Diferença de tempo
AAPH	2,2'-azobis (2-metilpropionamida) di-hidroclorido
AGS	Linha de células tumorais de adenocarcinoma gástrico
ANOVA	Análise de variância
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
BHT	2,6-Di-t-butil-4-metilfenol
C18:2n6c	Ácido linoleico
C18:3n3	Ácido alfa-linolénico
CaCo2	Linha de células tumorais de adenocarcinoma colorrectal
CCL4	Tetracloroeto de carbono
CIMO	Centro de Investigação de Montanha
CMB	Concentração mínima bactericida
CMF	Concentração mínima fungicida
CMI	Concentração mínima inibitória
DAD	Detetor de díodos
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DP	Desvio padrão
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazilo
EAU	Extração Assistida por Ultrassom
EC₅₀	Concentração de extrato correspondente a 50% da atividade antioxidante
EDTA	Ácido etilenediaminotetra-acético
ESI	Ionização por electrospray

FAME	Ésteres metílicos de ácidos gordos
FID	Detetor de ionização de chama
FL	Detetor de fluorescência
GC	Cromatografia gasosa
GC-FID	Cromatografia gasosa acoplada a um detetor de ionização de chama
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectrómetro de massa
GI₅₀	Concentração que inibe 50% do crescimento celular
h	Hora (s)
HBSS	Solução salina equilibrada de Hank
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HPLC-FL	Cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de fluorescência
HPLC-DAD-ESI/MS	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de diodos e espectrometria de massa com ionização por electrospray
HPLC/MS	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa
HPLC-RI	Cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de índice de refração
HT₅₀	Tempo correspondente a 50% de hemólise
IC₅₀	Concentração responsável por 50% da atividade
INT	Cloreto de <i>p</i> -iodonitrotetrazólio
IPB	Instituto Politécnico de Bragança
LC	Cromatografia Líquida
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i> – Lipoproteína de baixa densidade
LPS	Lipopolissacárideo
<i>m/v</i>	Relação massa/volume
m.f.	Massa fresca
MCF-7	Linha de células tumorais do adenocarcinoma de mama
MDA	Malondialdeído
MUFA	Ácidos gordos monoinsaturados

MEB	Meio de cultivo <i>Malt Extract Broth</i>
MS	Espectrometria de massa
m.f.	Massa Fresca
m.s.	Massa seca
N°	Número
na	Nenhuma atividade
nd	Não detetado
nt	Não testado
OxHLIA	Inibição da hemólise oxidativa
pH	Potencial hidrogeniônico
PANC	Planta alimentícia não convencional
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> – Reação em cadeia da polimerase
PE	Porcentagem de eritrócitos
PI	Padrão interno
PUFA	Ácidos gordos polinsaturados
rpm	Rotação por min
RAW 264.7	Linha de macrófagos de ratos
RPMI-1640	Meio de cultura <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SFA	Ácidos gordos saturados
SFB	Soro fetal Bovino
SGOT	Amino transferase de aspartato
SGPT	Amino transferase de alanina
SPSS	Pacote estatístico para as ciências sociais
SRB	Sulfarrodamina B
t	Tempo
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Inibição da formação de substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico

TCA	Ácido tricloroacético
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
Trolox	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
TSB	Meio de cultivo <i>Tryptone Soy Broth</i>
TTP	Proteína de transferência de alfa-tocoferol
Tween	Tensoativo não iônico
UFC	Unidade formadora de colónias
UPLC	Cromatografia ultrarrápida
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná
UV	Radiação ultravioleta
UV – VIS	Radiação ultravioleta-visível
v/v	Relação volume/volume
v	Vestígios
VERO	Linha de células não tumorais do rim de macaco verde africano
$\lambda_{\text{máx}}$	Comprimento de onda máximo

1. Revisão Bibliográfica

1.1. Plantas Alimentícias Não Convencionais

As plantas estão presentes na alimentação e na dieta do ser humano, representando cerca de 80% dos alimentos consumidos. No entanto, devido à falta de conhecimento e informação sobre os benefícios que podem proporcionar à saúde, apenas uma fração reduzida das espécies de plantas é conhecida e regularmente incorporada na dieta. (Romano & Gonçalves, 2015).

Neste âmbito, surgem as plantas alimentícias não convencionais, PANC como são popularmente conhecidas, designando as espécies de plantas que normalmente não estão presentes na alimentação da população, mas que podem ser consumidas e possuem propriedades únicas (Kinupp & Lorenzi, 2014; Sartori, *et al.*, 2020). As PANCs são reconhecidas pelo seu grande potencial nutritivo, são de fácil cultivo e crescem espontaneamente, adaptando-se a diversos ambientes e climas. São comumente designadas como “ervas daninhas”, “mato” ou “inço”, uma vez que se desenvolvem sem necessidade de cuidados específicos em qualquer parte. Aproximadamente 30 mil espécies de PANCs estão disponíveis para consumo (Kinupp & Barros, 2004; Kinupp & Lorenzi, 2014).

Incluir as PANCs na dieta pode auxiliar e melhorar a qualidade nutricional, bem como ampliar a variedade de sabores e texturas na alimentação. Infelizmente, a agricultura atual limita as variedades de plantas disponíveis para consumo devido à falta de informação sobre o cultivo e os benefícios (Leal, 2015).

Tais plantas, por serem nutritivas, podem contribuir para o combate à fome em regiões em que haja escassez de alimentos. Desta forma, a investigação sobre as propriedades nutricionais destas plantas é fundamental para a sua valorização e para promover hábitos alimentares mais saudáveis (Duarte, 2017).

Profissionais de saúde recomendam o consumo gradativo de frutas e vegetais, por possuírem compostos bioativos com propriedades benéficas tais como antioxidantes, anti-inflamatórias, antitumorais, antimicrobianas, antivirais, antipiréticas e analgésicas. Desta forma, estes compostos auxiliam a manter o sistema imunológico, protegendo o organismo contra doenças. Podem também prevenir doenças crónicas, como hipertensão, diabetes, obesidade e doenças cardiovasculares (Gaytán *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2016; Gharaati Jahromi, 2019).

Portanto, incluir as PANCs na dieta é uma escolha importante para manter a saúde e melhorar a qualidade de vida.

No Brasil, as hortaliças não convencionais são cultivadas tradicionalmente numa escala de agricultura familiar, preservando assim o conhecimento e transmitindo-o de geração em geração, o que representa uma mais-valia cultural, social, económica e nutritiva (MAPA, 2010). No entanto, a urbanização crescente ameaça o conhecimento tradicional de cultivo de plantas não convencionais, necessitando de incentivos para a continuação da produção e consumo destas PANCs (Leal, 2015).

1.2. Família Cucurbitaceae

A família das Cucurbitáceas é uma família diversificada, incluindo mais de 900 espécies em 130 géneros diferentes sendo considerada uma das maiores famílias de frutas e hortaliças (Mukherjee *et al.*, 2022). As plantas desta família crescem rapidamente, são dicotiledóneas, com flores, herbáceas e crescimento rastejante. Os seus frutos geralmente possuem casca resistente, polpa e sementes no interior. Entre as espécies desta família destacam-se pelo seu elevado consumo o melão (*Cucumis melo*), melancia (*Citrillus lanatus*), abóbora (*Cucurbita* spp.) e pepino (*Cucumis sativus*) (Barroso *et al.*, 2007).

As plantas da família Cucurbitaceae são originárias de regiões tropicais e estima-se que 90% das espécies que pertencem a esta família se encontram em territórios da África e Madagascar, sudeste da Ásia, América Central e do Sul (Avinash & Rai, 2017; Mukherjee *et al.*, 2022). Crescem vigorosamente em climas quentes, com solos argilosos ricos em nutrientes e com humidade, sendo importante evitar geadas durante o cultivo. Como são trepadeiras, podem ser cultivadas em estruturas verticais ou naturalmente no solo (McCreight, 2017).

Existem várias funcionalidades e formas de utilização das plantas desta família, incluindo na alimentação humana, medicina e também em usos veterinários. Além disso, são frequentemente empregadas como fonte de rações para animais aquáticos e aves. Há relatos de que estas plantas também possuem potencial de aplicação na indústria cosmética (Ajuru & Nmon, 2017).

Mukherjee *et al.* (2022) apresentaram num organograma detalhado (**Figura 1**) a classificação da família Cucurbitaceae. O estudo destaca que existem 4 subfamílias

principais: Cucurbitaceae, Sicyoeae, Momordiceae e Benincaseae, sendo que a subfamília Benincaseae é a que apresenta o maior número de espécies conhecidas.

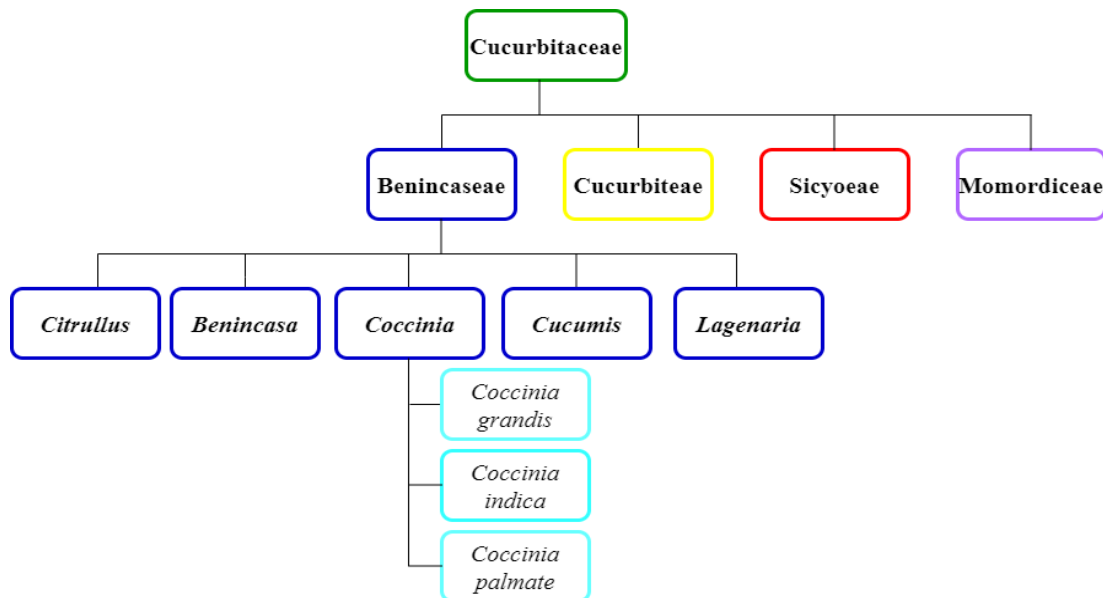


Figura 1. Taxonomia da família Cucurbitaceae (Fonte: Adaptado de Mukherjee, 2022).

O género *Coccinia* é a matriz deste estudo, cujo nome é derivado do latim “*Coccineus*”, do qual o significado diz respeito à cor do fruto de tom avermelhado a alaranjado. Essas plantas são trepadeiras consideradas perenes (Holstein, 2015). A espécie *Coccinia grandis* (L.) Voigt, pertencente à família Cucurbitaceae e à subfamília Benincaseae, é destacada entre as existentes por ser utilizada na medicina Ayurvédica e fitoterápica há centenas de anos (Mala *et al.*, 2014).

Portanto, os frutos da *C. grandis* em dois estados de maturação serão matrizes de estudo neste trabalho e será realizada uma investigação aprimorada das propriedades nutricionais, químicas e bioativas, pois há poucos estudos e informações técnico-científicas a respeito dos frutos desta espécie.

1.2.1. *Coccinia grandis* (L.) Voigt

Em termos botânicos, *C. grandis*, conhecida também como Cabeça de Hera, Ivy Gourd, Pepininho Silvestre, Pepino-Vermelho, Pepino Doce, Tindora ou Scarlet Gourd, é uma espécie de planta trepadeira pertencente à família Cucurbitaceae e subfamília Benincaseae. A sua cor vermelha é o que lhe dá o nome em diferentes línguas (Kinupp &

Lorenzi, 2014). Além disso, a espécie é conhecida por outros sinónimos, incluindo *C. cordifolia*, *C. indica*, *C. indica* Naud, e *Bryonia grandis* (Holstein, 2015).

A *C. grandis* dispõe da classificação taxonómica apresentada na **Tabela 1** (Monalisa *et al.*, 2014).

Tabela 1. Classificação taxonómica de *Coccinia grandis* (Fonte: Monalisa *et al.*, 2014).

Reino	Plantae
Divisão	Tracheophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordem	Cucurbitales
Família	Cucurbitaceae
Género	<i>Coccinia grandis</i> Wight & Arn
Espécie	<i>Coccinia grandis</i> (L.) Voigt

A planta é uma trepadeira perene tropical (**Figura 2**), com vida longa e poucos requisitos de manutenção. Para além de ser usada na alimentação, *C. grandis* é importante para a medicina tradicional, principalmente na Índia (ayurveda) e China, sendo considerada e classificada como uma importante planta medicinal devido às suas propriedades favoráveis para a saúde humana (Pekamwar *et al.*, 2013; Harine Sargunam, 2017; Sakarkar & Chauhan, 2017).



Figura 2. Planta *Coccinia grandis* (Fonte: A- Putra *et al.*, 2022; B- Kinupp & Lorenzi, 2014).

Os frutos verdes são consumidos *in natura* em saladas e os maduros, vermelhos/alaranjados, são consumidos como molhos ou geleia. Apresentam formato

elíptico, medindo 15 - 35 mm de diâmetro e o seu comprimento varia entre 25 - 60 mm, com casca lisa e sem pelos, possuindo sementes no seu interior (Pekamwar *et al.*, 2013; Kinupp & Lorenzi, 2014; Neetu *et al.*, 2020). De modo geral, os frutos da *C. grandis* são ricos em fibras, proteínas, hidratos de carbono, vitaminas do complexo B e minerais. São também conhecidos por possuírem componentes ativos como a taraxerona, taxerol, lupeol, glicosídeo de cucurbitacina B, entre outros. Assim que começam a ficar rosados, inicia-se o processo de amadurecimento e, nesta fase, os frutos são ricos em betacaroteno e outros nutrientes (Harine Sargunam, 2017).

Na **Figura 3** está representado o pepino verde e maduro, podendo ser observadas as suas características macroscópicas.



Figura 3. Frutos de *Coccinia grandis* (imaturado e maduro) (Fonte: globorural.globo.com).

1.2.2. Composição centesimal e química

O mercado consumidor está cada vez mais exigente em relação à composição, informação centesimal e química dos alimentos. Por isso, são relevantes os estudos sobre a caracterização dos alimentos, da mesma forma que o estudo relativo aos benefícios inerentes ao seu consumo também o são.

Na composição dos alimentos, os macronutrientes (hidratos de carbono, proteínas e lípidos) estão predominantemente presentes, sendo essenciais para o fornecimento de energia e nutrientes importantes para o desenvolvimento e sobrevivência dos seres humanos e animais. Os alimentos também contêm micronutrientes, como vitaminas e minerais, que são fundamentais para o adequado funcionamento do organismo. No entanto, eles são necessários em quantidades menores em comparação aos macronutrientes. Além disso, nem todos os micronutrientes são produzidos internamente pelo organismo, o que ressalta a importância de obtê-los através da alimentação. A

combinação de macronutrientes, micronutrientes e antioxidantes fitoquímicos é importante para uma dieta saudável (Ferreira *et al.*, 2009).

São limitadas as pesquisas que detalham os nutrientes presentes nos frutos de *C. grandis*, no entanto, alguns autores relatam que eles contêm: hidratos de carbono (3,10 g/100 g), proteínas (1,20 g/ 100 g), lípidos (0,10 g/ 100 g), vitamina C (1,40 mg/100 g), β -caroteno (4,03 μ g/100 g), potássio (30 mg/100 g), ferro (1,4 g/100 g) e cálcio (40 mg/100 g) (Beera *et al.*, 2022).

Existem vários tipos de vitaminas e são divididas em dois grupos, as lipossolúveis que incluem o retinol (A), calciferol (D), tocoferol (E) e fitomenadiona (K1), e as vitaminas hidrossolúveis, que são constituídas pelo ácido ascórbico e por vitaminas do complexo B (Shergill-Bonner, 2013).

Entre estas, evidencia-se a vitamina E pela sua elevada capacidade antioxidante. A vitamina E é constituída por quatro tocoferóis e quatro tocotrienóis, pertencendo assim a uma família de oito compostos originados a partir do tocol. Normalmente, a vitamina E é extraída das plantas ou também de macrofungos (Combs & McClung, 2022; Conceição *et al.*, 2017). Esta vitamina auxilia na proteção das membranas celulares e também das lipoproteínas plasmáticas contra as lesões que podem ser provocadas pelos radicais livres (Conceição *et al.*, 2017). A estrutura do α -tocoferol (**Figura 4**) é constituída por um anel cromanol e que desempenha a função antioxidante devido ao grupo hidroxila, sendo o α -tocoferol o isómero biologicamente mais ativo. A peroxidação lipídica é interrompida pela vitamina E, através da doação de átomos de hidrogénio aos radicais peroxil, originando assim radicais não reativos denominados de radicais tocoferoxilo (Ferreira *et al.*, 2009; Carocho e Ferreira, 2013).

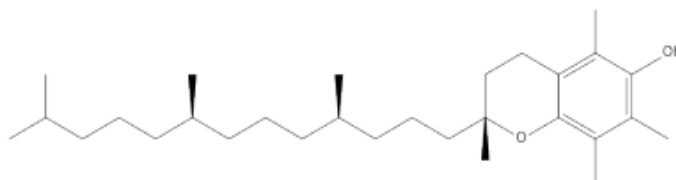


Figura 4. Estrutura química do α -tocoferol (Fonte: Carocho & Ferreira, 2013).

A ausência da vitamina E no organismo dos seres humanos pode provocar uma diminuição das defesas do sistema imunitário, por isso, uma dieta equilibrada com a inclusão de alimentos ricos em vitamina E é de extrema importância (Roberfroid *et al.*,

2008). Além disso, a ingestão de α -tocoferol é recomendada, pois do ponto de vista nutricional possui atividade mais elevada do que os restantes isômeros, como mencionado anteriormente (Monsen, 2000).

Outra vitamina de grande importância é a vitamina A, que pode ser encontrada em forma de retinol em alimentos de origem animal (fígado, leite, ovos, óleo de peixe), e na forma de carotenoides em alimentos de origem vegetal (legumes, vegetais folhosos verde-escuro e frutas amareladas e /ou verde escuro). É uma vitamina lipossolúvel, sendo necessária a ingestão de gorduras para uma eficiente absorção intestinal. Em proporções adequadas, o consumo da vitamina A é essencial para o bom funcionamento do organismo (Pinto de Lemos Júnior & Alves de Lemos, 2010) estando relacionada com as funções visuais, integridade epitelial e o funcionamento do sistema imunológico (Queiroz *et al.*, 2013).

Os pigmentos naturais conhecidos como carotenoides são responsáveis pela coloração amarela, laranja ou vermelha, e esta propriedade tem grande importância tecnológica, uma vez que a cor é o atributo que mais influencia a aceitação desses alimentos. Apesar de serem micronutrientes e estarem presentes em níveis muito baixos (microgramas por grama), os carotenoides são considerados constituintes alimentares de elevada importância, pois são substâncias bioativas com efeitos benéficos para a saúde, sendo que alguns apresentam atividade pró-vitamina A. São produzidos por vários organismos, incluindo plantas, algas, fungos, leveduras e bactérias. Alimentos de origem vegetal contêm uma variedade de carotenoides, enquanto alimentos de origem animal são mais limitados uma vez que estes não têm capacidade de sintetizar carotenoides e precisam obtê-los por meio da alimentação. Os carotenoides possuem efeitos benéficos à saúde além da atividade pró-vitamina A, como a imunomodulação e a redução do risco de doenças crônicas degenerativas como cancro, doenças cardiovasculares, cataratas e degeneração macular relacionada com a idade. Essas atividades fisiológicas são atribuídas às suas propriedades antioxidantes, que incluem a capacidade de captar o oxigênio singlete e interagir com os radicais livres (Rodriguez-Amaya *et al.*, 2008).

Assim, é evidente que as vitaminas são essenciais e desempenham um papel vital na manutenção da saúde e bem-estar. Manter uma alimentação diversificada é chave para obter a quantidade adequada destes nutrientes importantes.

1.2.3. Propriedades biológicas

Um composto bioativo pode ser definido como um componente que está naturalmente presente nos alimentos derivados de animais ou plantas, e que quando ingerido pode causar um efeito benéfico no organismo. Já um ingrediente bioativo, é a matéria que quando adicionada em formulações de alimentos, fornece benefício para a saúde de quem o consome (Fernandes *et al.*, 2019). As frutas, algas, vegetais, legumes e grãos são as fontes naturais mais comuns de compostos bioativos (Arroyo *et al.*, 2019).

As plantas possuem compostos bioativos importantes tais como antioxidantes e antimicrobianos, incluindo também polifenóis, vitaminas, carotenoides, açúcares redutores e ácidos gordos insaturados, que podem ser aplicados como aditivos alimentares na formulação de alimentos funcionais e nutracêuticos. Além disso, estão relacionados com a redução de várias doenças crônicas (Loziene *et al.*, 2007; Ferreira & Abreu, 2007).

Segundo Croteau *et al.* (2000), os compostos bioativos das plantas são divididos em três categorias principais, nomeadamente terpenos e terpenóides (próximo de 25.000 tipos), alcaloides (próximo de 12.000 tipos) e compostos fenólicos (próximo de 8.000 tipos), destacando-se os flavonoides e ácidos fenólicos.

As plantas apresentam valiosos compostos fenólicos responsáveis por diversas propriedades terapêuticas. Estes são caracterizados por incluírem na sua estrutura, no mínimo, um anel aromático e pelo menos um grupo hidroxilo (Rios *et al.*, 2014; Gharaati *et al.*, 2017; Gharaati Jahromi, 2019).

Os compostos fenólicos são produtos que resultam do metabolismo secundário e são sintetizados através de duas vias bioquímicas: a do acetato e do ácido chiquímico. Podem ser desde moléculas simples e pequenas, até moléculas mais complexas com compostos altamente polimerizados, sendo os flavonoides os compostos mais comuns (Ferreira *et al.*, 2009).

Em particular, os flavonoides auxiliam no crescimento, no desenvolvimento e na defesa da planta contra o ataque de patógenos (Dornas *et al.*, 2008). Os compostos fenólicos, particularmente flavonoides, têm ainda a finalidade de conferir cor, aroma, adstringência, sendo relevantes nas propriedades sensoriais e também estabilidade oxidativa aos alimentos (Soethe *et al.*, 2016). A estabilidade é conferida pela existência dos grupos aromáticos hidroxilados presentes na estrutura química, quer na forma livre ou ligados aos ácidos orgânicos, hidratos de carbono ou lípidos (Arruda *et al.*, 2020). São

encontrados na forma de glicosídeos ou agliconas, e estão presentes em várias partes das plantas como nas flores, sementes, folhas *etc.* (Angelo & Jorge, 2007). Tem sido demonstrado que os flavonoides possuem propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas e anticancerígenas, assim como também foi demonstrado que alguns terpenóides e esteroides são efetivos na prevenção do cancro devido ao seu efeito anti-carcinogénico (Harine Sargunam, 2017). A estrutura química de um flavonoide (**Figura 5**) contém dois anéis aromáticos ligados a uma cadeia composta por três carbonos (Carocho & Ferreira, 2013).

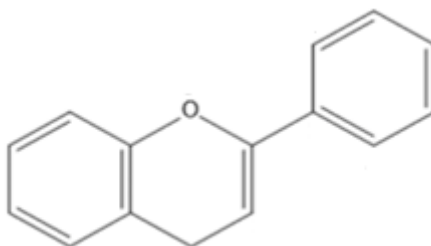


Figura 5. Estrutura básica da molécula flavonoide (Fonte: Adaptado de Huber & Rodriguez -Amaya, 2008).

Estes fitoquímicos provenientes das plantas possuem importantes propriedades que auxiliam na prevenção de doenças que são causadas pelo *stress* oxidativo. O *stress* oxidativo pode ocorrer naturalmente, principalmente em exposição a exercício físico extremo ou também em processos inflamatórios. A produção demasiada de radicais livres está relacionada com centenas de doenças como cancro, cirrose, doenças cardiovasculares, diabetes e desordens neurológicas (Ferreira & Abreu, 2007). Um radical livre é definido como um átomo ou molécula que não possui elétrons pareados, o que causa várias reações oxidativas tóxicas, como acúmulo de peróxidos de lípidos, fragmentação de moléculas como o DNA, entre outros (Deshpande *et al*, 2011a).

Kondhare e Lade (2017), demonstram que os extratos aquosos de frutos de *C. grandis* apresentam alguns fitoquímicos predominantes, como o ácido n-pentadecanóico (18,20%), ácido hexadecanóico (58,73%), ácido linoleico (5,78%), ácido oleico (1,10%), e α -tocoferol (11,72%), além de éster metílico do ácido hexadecanóico (0,32%) e tocoferol (11,72%). Varma e Bhaskar (2020), também verificaram que os extratos aquosos de frutos de *C. grandis* apresentaram alcaloides (1,32 mg/kg), flavonoides totais (2,58 mg/kg), saponinas totais (1,01 mg/kg) e fenóis totais (0,98 mg/kg).

Há estudos que indicam que *C. grandis* possui várias propriedades terapêuticas, tais como, propriedades antimicrobianas, antifúngicas, antioxidantes, anticancerígenas, antidiabéticas, antianafiláticas entre outras, o que tem sido associado à presença de compostos fenólicos, como referido anteriormente. Contudo, a eficácia fitoterapêutica ainda não é conclusiva devido à falta de conhecimento técnico-científico e de investigações científicas aplicadas. A maior parte dos estudos realizados utilizam extratos de caule, raiz, folhas ou em combinações, havendo poucos estudos que avaliam as propriedades terapêuticas dos frutos de *C. grandis* (Sakharkar & Chauhan, 2017).

Bulbul *et al.* (2011), relataram que os extratos metanólicos do fruto de *C. grandis* possuem elevada atividade antioxidante e glicosídeos de flavonoides. De forma similar, Deshpande *et al.* (2011b), concluíram que extratos dos frutos verdes de *C. grandis* apresentaram atividade antioxidante significativa, potencialmente devido à presença de flavonoides e glicosídeos de antraquinonas.

Vadivu *et al.* (2010) avaliaram o extrato alcoólico do fruto verde desta espécie em ratos de laboratório contra a hepatotoxicidade induzida pelo composto tetracloreto de carbono (CCl₄). O tratamento com 250 mg/kg de extrato etanólico do fruto reduziu consideravelmente o nível de transaminases (SGPT e SGOT) e também o nível de bilirrubina, efeitos que foram atribuídos aos antioxidantes presentes, nomeadamente aos flavonoides. Os flavonoides, triterpenos e taninos presentes no fruto podem interferir com a formação de radicais livres, o que confirma a sua atividade hepatoprotetora (Neetu, 2020).

Pattanayak (2009) avaliou os extratos metanólicos do fruto de *C. grandis* com o intuito de determinar a atividade analgésica e averiguar o seu uso no alívio da asma e da tosse. A atividade antitússica do extrato metanólico é comparada com a atividade da codeína. Neste estudo, os resultados obtidos mostraram que com a aplicação do extrato, a tosse foi inibida com a dose de 400 mg/kg e que o extrato metanólico do fruto atuou ao nível do sistema nervoso central.

No que diz respeito à atividade antimicrobiana, presume-se que os compostos fenólicos podem auxiliar na ruptura da membrana citoplasmática dos microrganismos, o que gera a perda de conteúdo celular e facilita a sua desnaturação (Msagati, 2012). A membrana citoplasmática é hidrofóbica e os agentes antimicrobianos dificultam a integridade da mesma e também afetam sua estrutura. As bactérias Gram-negativas

possuem uma camada de lipopolissacarídeos, o que as tornam mais resistentes aos compostos antimicrobianos, do que as Gram-positivas (Bouarab-Chibane *et al.*, 2018). A preocupação relacionada com o aumento e desenvolvimento de doenças infecciosas provocadas por microrganismos resistentes a desinfetantes e antibióticos é evidente.

Desta forma, surge a necessidade de desenvolver agentes antimicrobianos, destacando assim a utilização de plantas para esse fim, uma vez que os seus efeitos colaterais geralmente são reduzidos e o potencial terapêutico é elevado (Gadisa *et al.*, 2019; Rajput & Kumar, 2020). Estudos realizados por Sakharkar e Chauhan (2017), evidenciam que os frutos de *C. grandis* possuem maior atividade antimicrobiana do que as folhas.

1.2. Métodos de Extração de Compostos Bioativos

Os extratos de plantas, que podem ser obtidos a partir de folhas, flores, caules, frutos e raízes, são ricos em compostos bioativos e fitoquímicos valiosos. O método para extração destes compostos é fundamental, pois é o primeiro passo no estudo de caracterização das bioatividades da amostra selecionada. Amostra, solvente, pressão, temperatura e tempo são alguns dos parâmetros que podem afetar as características dos extratos (Azmir *et al.*, 2013; Cragg & Newman, 2013).

As técnicas de extração incluem as convencionais, como *Soxhlet*, decocção, hidrodestilação, infusão e maceração, que utilizam diferentes solventes, requerem temperatura e/ou agitação. Embora sejam as mais comuns, apresentam desvantagens tais como períodos de extração prolongados, baixa seletividade de extração, possibilidade de decomposição térmica de compostos termolábeis e necessidade de evaporação de grandes volumes de solventes (Azmir *et al.*, 2013). Além disso, o tratamento químico e o calor podem alterar as características dos compostos ativos na planta, resultando em extratos de qualidade insuficiente para análise (Gokoglu, 2018).

Para melhorar as dificuldades encontradas nas técnicas de extração convencionais, surgem as técnicas não convencionais ou modernas, tais como a extração com auxílio de ultrassons, micro-ondas, campos elétricos, enzimas, fluídos supercríticos e líquidos pressurizados. A extração assistida por ultrassom (EAU), é um método de alta eficiência que permite a extração rápida de compostos orgânicos e inorgânicos. Este método utiliza ondas sonoras que são capazes de penetrar nas células, criando bolhas que se expandem

até o seu rompimento, libertando assim os compostos bioativos. Este processo é conhecido como cavitação (Azmir *et al.*, 2013).

A produção de diferentes extratos desempenha um papel fundamental nas indústrias alimentícia, química e farmacêutica. Esses extratos são essenciais para a obtenção de compostos bioativos que podem ser aplicados no desenvolvimento de alimentos funcionais, ingredientes naturais, produtos químicos sustentáveis e medicamentos. Eles proporcionam propriedades benéficas aos alimentos, como antioxidantes e antimicrobianos, além de serem matérias-primas valiosas para a produção de cosméticos, corantes naturais e medicamentos terapêuticos. Em resumo, a produção de diferentes extratos é vital para a criação de produtos mais saudáveis, sustentáveis e com benefícios para a saúde e o bem-estar dos consumidores (FiB, 2018).

As amostras liofilizadas ou secas possuem mais tempo de durabilidade do que amostras frescas, sendo vantajoso, pois podem ser utilizadas ao longo dos ensaios sem deterioração e sem degradação dos compostos. Além disso, as amostras trituradas, em pó, são homogeneizadas facilmente e a superfície de contato entre amostra e solvente é maior, extraindo maiores quantidades de compostos (Azwanida, 2015).

1.3. Autenticidade da *Coccinia grandis* (L.) Voigt

Para o avanço da ciência, é essencial realizar uma identificação científica precisa das espécies vegetais durante o processo de estudo e investigação, a fim de assegurar a integridade e a confiabilidade dos resultados obtidos. Se uma espécie for identificada de forma equivocada, todo o tempo e esforço empregue na investigação pode tornar-se inútil e, ainda, gerar consequências/erros científicos graves. Se o erro não for detetado antes da publicação dos resultados, as informações divulgadas perdem o seu valor científico. Além disso, se os dados forem utilizados como base para outras investigações, isso pode gerar prejuízos significativos em termos científicos e financeiros (Martins-da-Silva, 2002).

Por isso, é fundamental garantir uma identificação precisa das espécies a serem estudadas. Tal pode ser realizado com base em conhecimentos botânicos da espécie ou pela realização de análises de DNA, sendo este, característico e único de cada espécie. A análise de DNA é um método essencial para assegurar resultados confiáveis em estudos científicos que requerem a autenticação da matriz usada, podendo também ser usado para investigar as relações evolutivas entre diferentes espécies de plantas, por meio de estudos filogenéticos (DeSalle & Goldstein, 2019).

1.4.1. Análise de DNA

A análise de DNA pode ser realizada em qualquer estágio da vida de um organismo, a partir de quase todos os seus tecidos. Além disso, as moléculas de DNA fornecem mais informações sobre um determinado organismo do que outras moléculas como as proteínas, e são mais facilmente extraídas, mesmo em pequenas quantidades de material orgânico (Reiter *et al.*, 2006). Adicionalmente, as moléculas de DNA apresentam maior estabilidade face ao processamento, frequentemente usado em alimentos (Trindade, 2010).

Por estes motivos, a análise de DNA é uma ferramenta essencial na detecção de adulterantes biológicos e na identificação de espécies geneticamente relacionadas. Permite ainda a fácil identificação de alimentos geneticamente modificados bem como a detecção de patógenos e alérgenos alimentares, incrementando a segurança alimentar (Oyarzabal & Kathariou, 2014).

Neste trabalho, a análise de DNA é importante pois comprova com precisão a espécie que será estudada, uma vez que outras espécies apresentam frutos com morfologia similar ao de *C. grandis*.

As técnicas utilizadas na análise de DNA em plantas incluem PCR (reação em cadeia da polimerase), sendo necessário apenas algumas cópias de DNA para a análise, sequenciação do DNA e análise de marcadores moleculares.

1.4.2. Fundamentos da PCR

A técnica de PCR baseia-se no mecanismo de replicação do DNA *in vivo* para amplificar segmentos específicos de DNA de qualquer parte do material genético que seja considerada um alvo e replicá-los inúmeras vezes. Uma típica amplificação de PCR envolve a utilização de DNA alvo, uma polimerase de DNA termoestável, dois oligonucleotídeos como *primers*, desoxirribonucleotídeos trifosfato (dNTP), tampão e magnésio. Após a mistura dos reagentes, a reação é realizada em três etapas distintas, que ocorrem em diferentes temperaturas. Cada conjunto de temperaturas é definido como um ciclo de amplificação, e esses ciclos são repetidos de 30 a 45 vezes, dependendo da quantidade de DNA inicial presente na reação (Mafrá *et al.*, 2008).

A amplificação de PCR produz produtos que podem ser analisados em relação ao tamanho, quantidade e sequência, podendo ser utilizados em diversos procedimentos experimentais. Uma das análises mais comuns é a separação dos fragmentos por

eletroforese, onde as bandas são detetadas por diferentes métodos, como coloração ou autorradiografia (Kumar *et al.*, 2009).

2. Objetivos

Planta silvestre é o termo que se usa para designar as plantas que se desenvolvem de forma espontânea e não necessitam de cuidados para o seu cultivo (Luczaj *et al.*, 2012). Segundo Romano e Gonçalves (2015), as plantas representam quase 80% dos alimentos consumidos no mundo, fazendo parte da dieta, tanto das opções vegetarianas ou não. Contudo, apenas algumas plantas são utilizadas na alimentação, uma vez que é escasso o conhecimento sobre os benefícios das plantas que normalmente não são consumidas, e assim, denominam-se plantas alimentícias não convencionais.

Neste sentido, o presente trabalho tem como OBJETIVO GERAL avaliar o valor centesimal, composição química e bioativa dos frutos de pepininhos silvestres (*C. grandis*) em dois estados de maturação (imaturo e maduro).

Para este efeito, os pepininhos silvestres foram colhidos entre os meses de outubro de 2021 e janeiro de 2022, no estado do Paraná, região sul do Brasil (25° 22'49"S 54° 3'8"W). Foram selecionados de acordo com o seu grau de maturação, no estado imaturo (verde) e no estado maduro (vermelho), com o intuito de contribuir para a sua caracterização e de os valorizar como mini-legumes e fomentar a inclusão na dieta.

Para alcançar o objetivo geral do trabalho, foram delineados os seguintes OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Analisar o DNA dos frutos, para autenticação das amostras como pertencendo à espécie *C. grandis*.
- Determinar o valor centesimal (lípidos, proteínas, cinzas, hidratos de carbono e energia) e composição química (ácidos gordos, açúcares livres, ácidos orgânicos, tocoferóis, carotenoides e compostos fenólicos) dos frutos de pepininhos silvestres em dois estados de maturação (imaturo e maduro).
- Determinar as bioatividades (atividade antioxidante, citotoxicidade em células tumorais e não-tumorais, anti-inflamatória e antimicrobiana) em dois extratos diferentes (extrato hidroetanólico por maceração e extrato hidroetanólico assistido por ultrassom).

3. Material e Métodos

3.1. Padrões e Reagentes

3.1.1. Análise de DNA

Para a extração de DNA das amostras de *C. grandis* foram utilizados os reagentes incluídos no kit comercial Nucleospin® Plant II (Macharey Nagel, Germany). Para a análise de PCR utilizou-se a DNA polimerase Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (New England), e os *primers forward* e *reverse* foram adquiridos na empresa Frilabo e sintetizados pela Metabion. Para o gel electroforese utilizou-se agarose, TAE e GelRed adquiridos à VWR.

3.1.2. Análise Química e Nutricional

Foram utilizados acetonitrilo 99,9%, *n*-hexano 95%, e acetato de etilo 99,8% de grau adequado para a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), sendo adquiridos na Lab-Scan (Lisboa, Portugal), e utilizou-se também etanol 99,8%, metanol 99,9%, hexano, éter de petróleo, éter etílico, sulfato de sódio nídro, ácido sulfúrico e ácido clorídrico de grau analítico, sendo adquiridos na empresa Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EUA). Os seguintes reagentes foram obtidos da Sigma-Aldrich Co (St. Louis, Missouri, EUA): clorofórmio, 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dicloridrato (AAPH), ácido tricloroacético (TCA-), tris e os padrões de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (trolox), açúcares (>98% pureza HPLC), ácidos orgânicos (≥99% pureza HPLC), e a mistura de ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME) (padrão 47885-U). Os padrões de tocoferóis (>98% pureza HPLC), tocol (50 mg/mL, 98% pureza HPLC), foram provenientes da Matreya (Pleasant Gap, Pensilvânia, EUA), e os padrões de compostos fenólicos e carotenoides da Extrasynthése (S.A., Genay, França).

O tratamento da água foi realizado usando um sistema de purificação de água Milli-Q (TGI Pure Water Systems, Greenville, Carolina do Sul, EUA).

3.1.3. Análise de Propriedades Bioativas

Atividade antioxidante: Os reagentes foram adquiridos na empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) bem como o tampão Tris-HCl, ácido ascórbico, FeSO₄, ácido

tricloroacético, cloreto de sódio e ácido tiobarbitúrico, além do padrão trolox (ácido 6-hydroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-carboxílico) e 2,2'-azobis (2-metilpropionamida) di-hidroclorido.

Potencial citotóxico: As linhas celulares tumorais humanas de adenocarcinoma intestinal (CaCo₂), adenocarcinoma mamário (MCF-7) foram obtidas no Instituto Leibniz - DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH, Braunschweig, Alemanha). A linha celular tumoral humana de adenocarcinoma gástrico (AGS) e a cultura de células não tumorais de rim de macaco (VERO-B4) foram obtidas da ECACC (Salisbury, UK). A *L*-glutamina, a solução salina equilibrada de Hank, a tripsina-EDTA (ácido etilenediaminatetra-acético), a solução de penicilina/estreptomicina (100 U/mL e 100 mg/mL), o meio RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) e o meio DMEM para células animais (Dulbecco Modified Eagle) foram fornecidos pela empresa Hyclone (Logan, UT, USA). O ácido acético, ácido fórmico, elipticina, sulforrodamina B, azul de Tripiano e Tris foram obtidos da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Atividades anti-inflamatória: Os macrófagos RAW 264.7 de rato foram obtidos da ECACC (European Collection of Animal Cell Culture) (Salisbury, UK), o meio DMEM da Hyclone (Logan, Utah, USA), os lipopolissacarídeos bacterianos da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) e o kit de reagentes Griess da empresa Promega (Madison, WI, USA).

Atividades antibacteriana e antifúngica: As bactérias contaminantes de alimentos, os fungos e os controlos positivos são provenientes da Frilabo (Porto, Portugal). O ágar malte foi obtido do Institute of Immunology and Virology, Torlak (Belgrade, Serbia). O corante Cloreto de *p*-iodonitrotetrazólio foi adquirido da Panreac Applichem (Barcelona, Espanha). Os outros reagentes e solventes de grau analítico foram adquiridos de fontes comuns.

3.2. Preparação das Amostras

Para os estudos e caracterização foram utilizados frutos imaturos (verdes) e maduros (vermelhos) de *C. grandis* (**Figura 6**). Os frutos colhidos cresceram de forma espontânea em jardins e hortas na região Oeste do Paraná - Brasil entre os meses de outubro de 2021 e janeiro de 2022. Após a colheita foram liofilizados e triturados, sendo transportados para o Centro de Investigação de Montanha (CIMO), onde foram armazenados e conservados ao abrigo da luz para realização das análises.



Figura 6. *Coccinia grandis* em seus dois estados de maturação imaturo (verde) e maduro (vermelho) (Fonte: Autoria própria).

3.3. Análise de DNA

3.3.1. Extração do DNA

O DNA foi extraído das amostras de pepininho utilizando o kit comercial Nucleospin Plant II segundo as instruções do fabricante. Primeiramente, pesou-se 100 mg das amostras (imaturo e maduro) para tubos estéreis de 2 mL. Para promover a lise das células adicionaram-se 400 μ L de tampão de lise PL1. O homogeneizador Precellys foi usado a 6200 rpm por 5 s e repetido três vezes. Depois, 10 μ L de RNase A foram adicionados, e a mistura foi incubada com agitação a 65 °C por 10 min. O lisado foi filtrado em filtro NucleoSpin (coluna de anel violeta), centrifugado a 11.000x g por 2 min, e o sobrenadante foi transferido para tubos estéreis de 1,5 mL e descartou-se a coluna. A fim de ajustar as condições de ligação do DNA à coluna, o sobrenadante foi combinado com 450 μ L de tampão e a solução foi misturada cinco vezes. Em seguida, a coluna fornecida no kit foi instalada e para a coluna (coluna de anel verde) foi transferido 700 μ L da mistura, centrifugou-se a 11.000 x g durante 1 min, descartando a solução eluída, sendo o processo repetido para o restante de volume da mistura. Para a lavagem da coluna, adicionou-se 400 μ L de tampão PW1, centrifugou-se a 11.000 x g durante 1 min, e descartou-se a solução eluída. Seguidamente, adicionou-se 700 μ L de tampão PW2 à coluna, e centrifugou-se a 11.000 g durante 2 min, e novamente descartou-se a solução de lavagem. Por fim, para eluição do DNA adsorvido na coluna adicionou-se 50 μ L de

tampão de eluição PE pré-aquecido a 65 °C à coluna NucleoSpin Plant II. A coluna foi incubada durante 5 min a 65 °C e centrifugada a 11.000 x g por 1 min, recolhendo-se o extrato de DNA num tubo novo de 1,5 mL.

3.3.2. Reação em Cadeia da Polimerase – PCR

Para a amplificação por PCR num termociclador T100 (BioRad, USA) utilizou-se 10,5 µL de H₂O, 12,5 µL de mix de DNA polimerase Q5, 0,5 µL de Primer Forward e 0,5 µL de Primer Reverse, por fim, adicionou-se 1 µL do extrato de DNA. Foram utilizados 40 ciclos com as seguintes condições: 94 °C por 1 min; 55 °C por 1 min; 72 °C por 1 min. Os primers utilizados foram selecionados da bibliografia para amplificação dos barcodes MatK e Rbcl, nomeadamente para MatK foi usado o conjunto de primers matK472F (5'-CCCRTY CAT CTG GAA ATC TTG GTT C-3') e matK1248R (5'-GCT RTR ATA ATG AGA AAG ATTTCT GC-3') (Yu *et al.*, 2011) e os primers aconselhados pelo Consortium for the Barcode of Life (CBOL) matK-KIM1R: 5'-ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGTTTC-3' e matK-KIM3F: 5'-CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG-3' (CBOL, 2009); para Rbcl usaram-se os primers rbcLa-F: 5'-ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC-3' e rbcLa-R: 5'-GTAAAATCAAGTCCACCRCG-3' (CBOL, 2009).

Para a visualização do produto obtido na amplificação, os fragmentos foram analisados por gel de eletroforese. Para isso pesou-se 0,8 g de agarose e adicionou-se em 40 mL de TAE e aqueceu-se a mistura em microondas em torno de 2 min até dissolver a agarose. Seguidamente, adicionou-se 2,5 µL de GelRed para visualização do DNA, e preparou-se o gel num tabuleiro de electroforese com o pente. Após secar, retirou-se o pente e na tina de eletroforese adicionou-se uma mistura contendo 2 µL de loading buffer e 3 µL do produto de PCR em cada poço. No final da eletroforese realizada a 95 V por 45 min, as bandas obtidas foram visualizadas num transiluminador de luz UV e captada a imagem.

Os produtos de PCR foram enviados para um laboratório especializado (STABVIDA, Lisboa, Portugal) para a sequenciação do DNA. Os resultados foram analisados e alinhados pelo programa BioEdit v7.2.5 (Ibis Bio- sciences, Carlsbad, CA, USA). Seguidamente foi feita uma análise de BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para identificação da espécie correspondente ao DNA analisado.

3.4. Caracterização Nutricional e Química

3.4.1. Composição Centesimal

Foi avaliada a composição em macronutrientes (cinzas, proteínas, lípidos e hidratos de carbono) conforme os métodos oficiais de análise de alimentos AOAC (2016). O teor de proteínas totais foi estimado pelo método macro-Kjeldahl por conversão do azoto total utilizando o fator de conversão ($N \times 6,25$). O teor de humidade foi determinado com base na diferença de massa obtida antes e depois da liofilização. Os lípidos foram determinados através da extração de uma massa conhecida da amostra com éter de petróleo, utilizando-se o aparelho de *Soxhlet*. O teor de cinzas foi determinado por incineração em mufla a 550 ± 15 °C e os resultados foram expressos em g/100 g de massa seca (m.s.). Os hidratos de carbono foram calculados por diferença, segundo a **Equação 1**. O sistema de *Atwater* foi utilizado para calcular a energia de acordo com a **Equação 2**.

$$\text{HC (g/100g m.s.)} = 100 - (\text{cinzas} + \text{proteínas} + \text{lípidos})$$

Equação 1. Hidratos de carbono em g/100 g m.s

$$\text{ET (kcal/100g m.s.)} = 4 \times (\text{g proteínas} + \text{g hidratos de carbono}) + 9 \times (\text{g lípidos})$$

Equação 2. Energia total em quilocaloria (kcal/100g m.s.)

3.4.2. Açúcares Livres

A determinação dos açúcares livres foi realizada com base na metodologia descrita por Obodai *et al.* (2016), utilizando um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de índice de refração (HPLC-RI).

Às amostras liofilizadas (~1 g) foi adicionado 1 mL de padrão interno (PI, melezitose, 25 mg/mL) e posteriormente procedeu-se à extração com 40 mL de etanol 80% a 80 °C durante 1 h 30 min. Posteriormente, a amostra foi filtrada, o etanol evaporado e o sobrenadante obtido foi lavado três vezes sucessivas com 10 mL de éter etílico, ocorrendo a deslipidificação da fase aquosa. Após a evaporação a 40 °C, o resíduo sólido foi dissolvido em água destilada para um volume final de 5 mL. Em seguida, utilizou-se filtros de *nylon* de 0,2 µm para a filtração da solução para *vials*, procedeu-se à análise por HPLC-RI a 35 °C (sistema HPLC Knauer, sistema Smartline) equipado com um detetor de RI (Knauer Samartiline 2300) e com uma coluna 100-5 NH₂ Eurospher (4,6 × 250 mm,

5 mm, Knauer). Como fase móvel utilizou-se acetonitrilo/água desionizada, 70:30 (v/v) com um caudal de 1 mL/min. A identificação e quantificação dos açúcares foi realizada por comparação cromatográfica com padrões comerciais e usando o método do PI. Os resultados obtidos foram expressos em g por 100 g de m.s.

3.4.3. Ácidos Orgânicos

Os ácidos orgânicos foram determinados por cromatografia líquida ultrarrápida com detector de díodos (UPLC-DAD), conforme a metodologia descrita e otimizada por Barros *et al.* (2012). Procedeu-se à extração de ~1 g das amostras liofilizadas com 25 mL de ácido metafosfórico (25 °C a 150 rpm) em agitação constante durante 25 min. As soluções foram filtradas através de papel filtro Whatman N° 4 e seguidamente através de filtros de *nylon* de 0,2 µm (Millipore) para *vials*. Os ácidos orgânicos foram analisados utilizando um sistema Shimadzu 20A séries UFLC (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) equipado com uma coluna de fase reversa C18 SphereClone (Phenomenex 5 µm, 250 × 4,6 mm), termostaticada a 35 °C. A eluição foi realizada com ácido sulfúrico 3,6 mM usando um caudal de 0,8 mL/min. A detecção foi efetuada num detector DAD, utilizando 215 nm e 245 nm (para ácido ascórbico) como comprimentos de onda. Os ácidos orgânicos identificados foram quantificados por comparação da área dos picos com as curvas de calibração obtidas a partir de padrões comerciais de cada composto. Os resultados foram expressos em g por 100 g de m.s..

3.4.4. Ácidos Gordos

A partir da fração lipídica obtida anteriormente pela extração de *Soxhlet*, procedeu-se a derivatização dos ácidos gordos utilizando a metodologia descrita por Spréa *et al.* (2020). 5 mL de metanol:ácido sulfúrico:tolueno (2:1:1, v/v/v) foram adicionados à fração lipídica e incubados por 12 h a 50 °C e 160 rpm. Após a incubação, foram adicionados 3 mL de água destilada e 3 mL de éter dietílico, agitou-se vigorosamente com a ajuda de um vortex. A fase orgânica contendo os FAME foi removida, desidratada com sulfato de sódio anidro e filtrada com filtros de *nylon* de 0,2 µm (Millipore) para análise posterior.

O perfil de ácidos gordos foi obtido num sistema YOUNG IN Crhomass 6500 de cromatografia gasosa (GC) equipado com um injetor *split/splitless* a 250 °C e injeção *split* a

1:80, detetor de ionização de chama (FID) a 260 °C e uma coluna Zebron-Fame (20 m × 0,18 mm × 0,15 µm *df*).

O programa de temperatura do forno obedeceu à seguinte configuração: a temperatura inicial da coluna foi 80 °C, durante 1,5 min; em seguida, aumentou-se a temperatura a 40 °C/min até 160 °C, 5 °C/min até 185 °C, 30 °C/min até 260 °C durante 4 min. O hidrogénio (gás de transporte) tinha um caudal de 0,6 mL/min (0,61 bar), medido a 250 °C. Para cada análise injetou-se 1 µL da amostra. A identificação de ácidos gordos foi feita com base nos tempos de retenção relativos dos picos da mistura padrão de 37 FAMES e das amostras. Os resultados foram processados usando o software Clarity 4.0.1.7 (DataApex, Podohradska, República Checa) e expressos em percentagem relativa de cada ácido gordo.

3.4.5. Tocoferóis

Os tocoferóis foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de fluorescência (HPLC-FL) conforme o procedimento descrito por Martins *et al.* (2016). Antes da extração, a amostra liofilizada (~500 mg) foi adicionada com uma solução BHT em hexano (10 mg/mL, 100 µL) e o padrão interno (PI) (Tocol em hexano 50 µg/mL; 400 µL). Adicionou-se 4 mL de metanol e a mistura foi homogeneizada com auxílio de um *vortex* durante 1 min. Após, 4 mL de hexano foram adicionados e homogeneizados novamente por 1 min, seguindo-se a adição de 2 mL de uma solução aquosa saturada de NaCl e subsequente homogeneização por mais 1 min. Por fim, centrifugou-se (centrifuga refrigerada Multifuge X1R, Thermo Fischer Scientific, 5 min, 4000 x *g*) e transferiu-se o sobrenadante para um frasco âmbar. A amostra foi re-extraída por mais duas vezes com hexano e desidratada com sulfato de sódio anidro. O extrato foi seco com uma corrente de azoto. Em seguida foi redissolvido em 2 mL de hexano, filtrado (filtros de 0,22 µm) para *vials* âmbar e analisados por HPLC-FL.

Foi utilizado um sistema integrado de bomba quaternária (Knauer, sistema Smatline 1000), um desgaseificador (Smartline 5000), um amostrador automático (AS-2057 2500) e um detetor de fluorescência (FL, Jasco) programado para excitação a 290 nm e emissão a 330 nm. A separação cromatográfica foi conseguida com uma coluna em fase normal Poliamida II (5 µm, 250 × 4,6 mm, WMC Waters, Japão), operando a 30 °C (forno 7971 R Grace). A fase móvel utilizada foi uma mistura de hexano/acetato de etilo (70:30, *v/v*) com um caudal de 1 mL/min.

A quantificação foi baseada na resposta do sinal de fluorescência, usando o método do PI e por comparação cromatográfica com padrões. Os resultados foram expressos em mg por 100 g de m.s.

3.4.6. Carotenoides Totais

Para a extração dos carotenoides foi utilizado a metodologia adaptada de Mercadante *et al.* (2017). Primeiramente pesou-se 0,15 g de cada amostra em tubos de teflon. Todos os tubos, balões de fundo redondo e *elermeyers* a serem utilizados foram protegidos com papel alumínio para evitar exposição à luz, além de todo o procedimento ser realizado em penumbra. Em cada tubo adicionou-se 5 mL de acetato de etilo, e agitou-se com um auxílio de um *vortex* durante 3 min e em seguida centrifugaram-se os tubos durante 5 min (12.000 x g a 4 °C). Seguidamente, o sobrenadante foi recolhido para um balão de fundo redondo. Este procedimento foi repetido até que o sobrenadante estivesse incolor. De seguida, adicionou-se 5 mL de metanol e repetiu-se o processo anterior, até que o sobrenadante estivesse incolor.

Os extratos foram concentrados no evaporar rotativo ($t < 35$ °C), suspensos no balão com éter etílico e éter de petróleo (1:1) e transferidos para um tubo de teflon até que não fosse mais visível cor no solvente. Foi preparada uma solução aquosa de NaCl 10% (*m/v*) e 10 mL foram adicionados no balão e passados para o tubo. Os tubos com a solução foram centrifugados com os mesmos parâmetros utilizados na extração. Os sobrenadantes dos tubos foram cuidadosamente transferidos para balões de fundo redondo, evitando transferir a solução aquosa, e os extratos concentrados no evaporador rotativo. O procedimento resultou em extratos isentos de agentes que podem interferir nos resultados, como por exemplo, a pectina que pode estar presente na casca dos vegetais.

Por fim, o extrato foi retirado do balão com auxílio de éter de petróleo até que não houvesse mais cor visível, transferindo-os para frascos de vidro devidamente identificados e protegidos da luz. Finalizou-se com a secagem dos extratos em N₂. Os extratos secos foram armazenados sob refrigeração (-20 °C) e para a realização da leitura espectrofotométrica a 450 nm (ZUZI spectrophotometer 4255/50), foram redissolvidos em éter de petróleo. Os resultados foram expressos em µg/g m.s.

3.4.7. Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos presentes nos extratos das amostras obtidos por maceração e EAU foram determinados através da metodologia descrita por Bessada *et al.* (2016), em um cromatógrafo líquido de alta performance Thermo Scientific (HPLC - Dionex UltiMate 3.000 series, Thermo Fisher Scientific - San Jose, CA, EUA) equipado com um detector de arranjo de diodos (DAD) e conectado em série a um espectrômetro de massas com analisador Ion trap (MS, LTQ, Thermo Fisher Scientific - San Jose, CA, EUA). Os compostos fenólicos foram separados em uma coluna Spherisorb S3 ODS-2 C18 (3 µm, 4,6 x 150 mm, Waters - Milford, EUA) mantida a 35 °C, com um gradiente de 0,1% (v/v) de ácido fórmico em água ultrapura (A) e acetonitrilo (B). A proporção da fase móvel (A:B, %) foi mantida inicialmente em 85:15 durante 5 min e variou para 80:20 em 5 min, chegando a 75:25 em 10 min, 65:35 em 10 min e 50:50 em 10 min, retornando em 10 min à condição inicial, que foi mantida durante 10 min para condicionamento da coluna. O fluxo foi de 0,5 mL/min. Os espectros UV-Visível (UV-Vis) foram adquiridos entre 180 a 700 nm, e os cromatogramas processados em 280, 330 e 370 nm para as diferentes classes de compostos fenólicos. O eluato do HPLC foi analisado por espectrometria de massa em tandem e os compostos foram ionizados usando uma fonte ESI (electrospray) operando em modo negativo. Os espectros *full* MS e MS/MS foram adquiridos na faixa de 110 a 1800 relação carga/massa (m/z).

Para a identificação dos compostos, a ordem de eluição na coluna C18 e as características dos espectros UV-Vis e de massas (íon molecular ([M-H]⁻) e fragmentos MS/MS) foram interpretados e comparados com padrões, quando disponíveis, e dados da literatura. A quantificação foi realizada utilizando curvas de calibração externa de padrões de ácido clorogénico ($y = 49180x - 5838$), ácido cafeico ($y = 90492x - 29265$), ácido ferulico ($y = 85718x + 68543$), ácido *p*-coumárico ($y = 76029x + 102258$), quercetina-3-*O*-glicosídeo ($y = 28555x + 3032.3$), quercetina-3-*O*-rutinosídeo ($y = 28555x + 3032.3$), e kaempferol-3-*O*-rutinosídeo ($y = 20292x + 2645.8$).

Os resultados de compostos fenólicos foram expressos em mg/ g de extrato.

3.5. Preparação dos Extratos

Para a determinação das propriedades bioativas dos pepininhos-silvestres foram utilizados dois métodos de extração a fim de obter extratos hidroetanólicos, maceração com agitação e extração assistida por ultrassom (EAU). Para a maceração, pesou-se 4 g

de cada amostra dos frutos liofilizados e triturados, adicionou-se 120 mL da mistura etanol/água (80:20 *v/v*) sob constante agitação magnética, à temperatura ambiente, durante uma hora. Após, a mistura foi filtrada em papel Whatman N° 4 para um balão volumétrico, e o resíduo do filtrado foi re-extraído repetindo o procedimento. As obtenções dos extratos foram finalizadas evaporando o etanol no evaporador rotativo a 40 °C (Hei-VAP, Heidolph), a porção aquosa foi congelada e liofilizada.

O segundo método de extração (EAU) consistiu em pesar 3 g de cada amostra liofilizada, à qual foi adicionada 90 mL da mistura etanol/água (80:20 *v/v*), utilizando um aparelho de sonda ultrassônica (CY-500, Optic Ivymen System, Barcelona, Espanha). Os parâmetros utilizados foram baseados no trabalho de Hossain *et al.* (2012) e Kobus *et al.* (2022) com algumas alterações. Nomeadamente, realizaram-se ensaios com tempos de 5, 10 e 15 min para a extração, a potência do equipamento foi ajustada a uma intensidade de 99%, ou seja, a potência igual a 500 W, a temperatura foi mantida a 10 °C e a frequência do equipamento fixa a 20 kHz. No final, obteve-se três extratos com tempos de extração distintos. Após a extração, os extratos foram filtrados, o etanol evaporado no evaporador rotativo a 40 °C (Hei-VAP, Heidolph), seguido de congelação e liofilização. Para ambos os métodos de extração foi utilizada uma razão sólido/líquido de 30 g/L.

3.6. Propriedades Bioativas

3.6.1. Atividade Antioxidante

A avaliação do potencial antioxidante foi determinada nos extratos hidroetanólicos. Para tal, foram realizados dois ensaios *in vitro* segundo a metodologia descrita por Sarmento *et al.* (2014) e Lockowandt *et al.* (2019):

- Inibição da peroxidação lipídica, TBARS (espécies reativas do ácido tiobarbitúrico), determinado por espectrofotometria UV-visível no comprimento de onda de 532 nm.
- Ensaio da inibição da hemólise oxidativa (OxHLIA).

3.6.1.1. Inibição da peroxidação lipídica através de produtos reativos do ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Neste ensaio, os TBARS foram obtidos a partir de tecidos cerebrais de porco (*Sus scrofa*), de animais abatidos. Para tal, o tecido cerebral foi homogeneizado em solução

tampão Tris-HCL (20 mM e pH 7,4) para se obter uma porção de 1:2 (*m/v*) de homogeneizado cerebral após a centrifugação a 5000 rpm durante 10 min. Às diluições preparadas (10 a 0,3125 mg/mL, 200 µL), adicionou-se 100 µL do sobrenadante 100 µL de FeSO₄ (10 mmol/L) e 100 µL de ácido ascórbico (0,1 mmol/L). Após incubação a 37 °C durante 1 h, parou-se a reação através da adição de 500 µL de ácido tricloroacético (28%, *m/v*), seguido do ácido tiobarbitúrico (TBA 2%, *m/v* 380 µL). Em seguida, a mistura foi aquecida a 80 °C durante 20 min e centrifugada a 3000 rpm durante 10 min para remover o precipitado proteico. A intensidade da cor do complexo malondialdeído (MDA) – TBA no sobrenadante foi medida a 532 nm e a inibição da peroxidação lipídica (%) foi calculada segundo a equação (3), onde A corresponde a absorbância do controle e B a absorbância da amostra. Os resultados foram expressos em valores de concentração de extrato que produz 50% de atividade antioxidante (mg/mL).

$$\% = \frac{(A - B)}{A} \times 100$$

Equação 3. Taxa de inibição em ensaio TBARS

3.6.1.2. OxHLIA – ensaio da inibição da hemólise oxidativa

Para a realização deste ensaio celular, foi efetuada uma colheita de sangue de ovelha do qual foram obtidos apenas os eritrócitos por centrifugação (Multifuge X1R, Thermo Fisher Scientific) a 2900 rpm, durante 5 min a 10 °C. Após a eliminação do sobrenadante, a amostra centrifugada foi submetida a uma lavagem com NaCl (150 mM) seguida de três lavagens com tampão fosfato-salino (PBS; pH 7.4), procedendo-se a centrifugação e remoção do sobrenadante a cada lavagem. Em seguida preparou-se uma solução de eritrócitos a 2,8% (*v/v*) tendo como diluente o PBS. Posteriormente, 200 µL da solução de eritrócitos foram adicionados a 400 µL de PBS, (servindo esta solução de controle), bem como às diferentes concentrações de extrato dissolvidas em PBS (20 a 0,625 mg/mL). Realizou-se ainda a adição da solução de eritrócitos à água (para promover a hemólise completa), funcionando como um controle negativo.

Os ensaios foram realizados em microplacas de 96 poços, as quais foram incubadas a 37 °C durante 10 min com agitação. Após o período de incubação, foram adicionados 200 µL de dicloridrato de 2,2'-azobis(2-amidinopropano) (AAPH; 160 mM) e a densidade ótica foi medida a 690 nm. As microplacas foram depois incubadas nas

mesmas condições até hemólise completa, com medições a cada 10 min. A percentagem da população de eritrócitos (PE) que permanece intacta foi calculada conforme a equação (4):

$$PE (\%) = \frac{(St - CH_0)}{(S_0 - CH_0)} \times 100$$

Equação 4. Percentagem de eritrócitos (PE) no ensaio OxHLIA

Onde St e S0 correspondem à densidade ótica da amostra num instante de tempo t e 0 min, respetivamente e CH₀ é a densidade ótica correspondente à hemólise completa aos 0 min. Os resultados foram expressos como tempo de atraso da hemólise (Δt), calculado da seguinte equação (5):

$$\Delta t (\text{min}) = Ht_{50(\text{amostra})} - Ht_{50(\text{controlo})}$$

Equação 5. Tempo de atraso da hemólise

Onde Ht₅₀ é o tempo correspondente a 50% de hemólise (min), obtido graficamente a partir da curva de hemólise para cada concentração de amostra antioxidante.

O trolox (7,81–250 µg/mL) foi utilizado como controlo positivo. Foram estabelecidas correlações entre os valores de Δt e as diferentes concentrações de amostra, de forma a calcular a concentração capaz de retardar a hemólise em 60 min (IC₅₀ (60 min), mg/mL) e em 120 min (IC₅₀ (120 min), mg/mL).

3.6.2. Citotoxicidade

A atividade citotóxica foi avaliada *in vitro* nos extratos hidoetanólicos através do ensaio da Sulforrodamina B (SRB) (Abel & Baird, 2018). Foram testadas três linhas celulares tumorais humanas: MCF-7 (adenocarcinoma de mama), AGS (adenocarcinoma gástrico), CaCo₂ (células do intestino). Foi também utilizada uma linha não tumoral de células de rim de macaco verde africano (VERO) com o intuito de verificar o efeito citotóxico dos extratos em células saudáveis.

Uma massa conhecida de cada um dos extratos (8 mg) foi dissolvida em água (8 mg/mL), a partir das quais se procedeu a diluições sucessivas obtendo as concentrações

a testar (400 a 6,25 µg/mL). As células foram cultivadas numa incubadora de ar humidificado com 5% de CO₂, em frascos de cultura de tecidos de 25 cm² e suplementadas com RPMI 1640 com 10% de soro fetal bovino, 2 mM de aminoácidos não essenciais e glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina. As células foram monitoradas num microscópio de contraste de fase (Icon Eclipse Ts 100).

Começou-se por retirar o meio de cultura do frasco de cultura com as células e lavou-se com solução salina (HBSS, 2 mL). Descartou-se o meio de lavagem e adicionou-se tripsina (2,5 mL) para desagregar as células da caixa de cultura, levando-se a incubar durante três min. Em seguida, adicionou-se meio de cultura (5 mL) de modo a neutralizar a ação da tripsina, e colocou-se a suspensão da linha celular em tubos de Falcon estéreis para centrifugar (1500 g por 5 min). Descartou-se o meio de cultura com tripsina e retirou-se a suspensão celular (75 µL) para um *eppendorf* à qual se juntou a mesma quantidade (75 µL) de azul tripano para se proceder à contagem de células numa câmara de *Neubauer*. Posteriormente, os extratos (10 µL) foram colocados em microplacas de 96 poços juntamente com o volume de suspensão celular calculado para a densidade estabelecida e perfez-se o volume do poço com meio de cultura. De seguida, as microplacas armazenaram-se devidamente seladas durante 72 h a 37 °C com humidade e 5% de CO₂. Já com as células devidamente aderidas, desprezou-se o conteúdo da microplaca e deu-se início ao teste da SRB pela adição de ácido tricloroacético frio (10%, 100 µL) a cada um dos poços e pela incubação a 4 °C por 60 min. Após tal, lavaram-se devidamente com água destilada e as microplacas foram colocadas a secar. Adicionou-se então a SRB (0,1 em 1% ácido acético; 100 µL) incubando de seguida durante 30 min à temperatura ambiente. A placa foi novamente lavada, desta vez com ácido acético (1%) de modo a retirar cuidadosamente o excesso de SRB e deixou-se secar. Solubilizou-se a SRB com Tris (200 µL, pH 7,4) com auxílio de um agitador de microplacas (Stat Fax-2100) e procedeu-se à leitura da absorbância no leitor de microplacas referido previamente.

Os resultados foram expressos em termos da concentração de extrato com capacidade para inibir o crescimento celular em 50% - GI₅₀, µg/mL. Como controlo positivo foi utilizada a elipticina. Todo o ensaio foi efetuado em ambiente assético numa câmara de fluxo laminar vertical (TLStar, AV-30/70).

3.6.3. Atividade Anti-inflamatória

A atividade anti-inflamatória foi avaliada utilizando uma linha celular de macrófagos de rato RAW 264,7, com base na produção de óxido nítrico determinado através da medição da absorbância a 515 nm utilizando um leitor de microplacas (Sobral *et al.*, 2016).

Os extratos hidroetanólicos foram dissolvidos em H₂O a fim de obter a concentração final de 8 mg/mL, a partir dos quais foram efectuadas diluições sucessivas, obtendo-se as concentrações a testar (0,125 - 8 mg/mL).

A linha celular de macrófagos de rato RAW 264.7, foi cultivada em meio DMEM, suplementada com soro fetal bovino (SFB) inativado pelo calor (10%), glutamina e antibióticos, e mantida numa incubadora a 37 °C, com 5% de CO₂ e sob uma atmosfera húmida.

As células foram destacadas com um raspador de células. Uma alíquota da suspensão celular de macrófagos (300 µL) com uma densidade celular de 5×10^5 células/mL e com uma proporção de células mortas inferior a 5% de acordo com o teste de exclusão *Trypan blue*, foi colocada em cada poço. A microplaca foi incubada durante 24 h na incubadora com as condições anteriormente indicadas de forma a permitir uma adequada aderência e multiplicação das células. Após esse período, as células foram tratadas com diferentes concentrações de extrato (15 µL, 0,125 - 8 mg/mL) e incubadas durante uma hora, sendo que o intervalo de concentrações testadas foi de 6,25 - 400 µg/mL. Procedeu-se à estimulação com a adição de 30 µL da solução lipossacarídeo - LPS (1 mL/mL) e incubou-se durante mais 24 h. Foi utilizado como controlo positivo a dexametasona (50 mM) e como controlo negativo, as amostras na ausência de LPS.

A quantificação do óxido nítrico foi realizada utilizando um *kit* do sistema reagente *Griess* (nitrofenamida, etilenodiamina e soluções de nitritos) e através da curva de calibração de nitrito (nitrito de sódio 100 mM a 1,6 mM) preparada numa placa de 96 poços. O óxido nítrico produzido foi determinado através da leitura das absorbâncias a 540 nm (leitor de microplacas ELX800 Biotek, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA) e pela comparação com a reta de calibração padrão ($y = 0,0063x + 0,1368$, $R^2 = 0,9989$).

Os resultados foram calculados através da representação gráfica da percentagem de inibição da produção de óxido nítrico *versus* a concentração da amostra, e expressos

em relação à concentração de cada um dos extratos que provoca a inibição, em 50%, da produção de óxido nítrico - IC₅₀.

3.6.4. Atividade Antibacteriana e Antifúngica

A atividade antimicrobiana foi avaliada através método descrito por Pires *et al.* (2018), utilizando o método colorimétrico rápido por microdiluição e utilizando o corante INT (cloreto de *p*-iodonitrotetrazólico).

As estirpes utilizadas compreendem três bactérias Gram-positivo: *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*, e cinco bactérias Gram-negativo: *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica subsp.* e *Yersinia enterocolitica*, sendo isoladas de alimentos.

As bactérias foram cultivadas em frasco apropriado a 37 °C, 24 h antes da análise, garantindo o crescimento exponencial.

As amostras foram primeiramente dissolvidas em 5% (v/v) de sulfóxido de dimetilo (DMSO) e 95% de água destilada autoclavada, obtendo uma concentração final de 20 mg/mL, 100 µL desta concentração foi adicionada em duplicado no primeiro poço de uma microplaca contendo 96 poços, 90 µL de caldo triptona de soja (TSB) foi adicionado em todos os poços. As amostras foram diluídas em série a fim de obter concentrações de 10 a 0,03125 mg/mL. De seguinte, 10 µL de inóculo (normalizado a 1,5 x 10⁶ Unidades Formadoras de Colônias (UFC) /mL) foi adicionado em todos os poços, assegurando a presença de 1,5 x 10⁵ UFC. Dois controlos negativos foram preparados, um TSB e outro com o extrato, bem como dois controlos positivos, um com TSB e cada inóculo, e o outro controlo com meio, antibiótico e bactéria, respectivamente. A ampicilina e estreptomina foram utilizadas para todas as bactérias analisadas, e a metilina foi utilizada para o *Staphylococcus aureus*. As microplacas foram incubadas durante 24 h, a 37 °C. O CMI das amostras foi identificado após adição de 40 µL de 0,2 mg/mL de cloreto de *p*-iodonitrotetrazólio (INT) e incubação a 37 °C durante 30 min. O CMI é definido como a concentração mais baixa que inibe o crescimento bacteriano visível, sendo identificado quando a coloração muda de amarelo para rosa, caso os microrganismos sejam viáveis. Para a determinação da concentração mínima bactericida (CMB), 10 µL de líquido de cada poço que não apresentou mudança de cor foi cultivada em meio sólido ágar sangue (7% sangue de ovelha) e incubado a 37 °C durante 24 h. A

concentração mais baixa que não produziu crescimento determina o CMB, o qual é definido como a concentração mais baixa necessária para matar bactérias.

A atividade antifúngica foi avaliada pelo método descrito por Heleno *et al.* (2013), sendo os fungos utilizados *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus brasiliensis*. Os fungos macroscópicos foram mantidos em ágar extrato de malte e armazenados a 4 °C, em seguida foram colocados em meios novos e incubados a 25 °C por 12 h. A fim de determinar a atividade antifúngica, os esporos fungicos foram lavados da superfície das placas de ágar com 0,85% soro fisiológico estéril contendo 0,1% Tween 80 (v/v). A suspensão de esporos foi ajustada com solução salina estéril a uma concentração de aproximadamente $1,0 \times 10^5$, num volume final de 100 µL por poço. As amostras foram dissolvidas em 5% (v/v) de DMSO e 95% de água destilada autoclavada para dar uma concentração final de 10 mg/mL de solução *stock*. Posteriormente, 90 µL desta concentração foi adicionado no primeiro poço (microplaca de 96 poços) em duplicado com 100 µL de Caldo de Extrato de Malte (MEB). Nos restantes poços foram colocados 90 µL de MEB. Depois, as amostras foram diluídas em série a fim de obter o intervalo de concentrações a serem testadas (10 a 0,03125 mg/mL). As determinações da concentração inibitória mínima (CMI) foram realizadas por meio da técnica de diluição seriada utilizando uma microplaca de 96 poços. As concentrações mais baixas sem crescimento visível (observadas por microscópio binocular) foram definidas como CMIs. A concentração mínima fungicida (CMF) foi determinada por subcultivo seriado de 2 µL dos compostos testados, dissolvidos em meio de cultura e inoculados por 72 h em microplacas contendo 100 µL de MEB por poço. Após essa etapa, as microplacas foram incubadas por mais 72 h a 26 °C. A concentração mais baixa sem crescimento visível foi definida como CMF, indicando uma redução de 99,5% do inóculo original. O fungicida comercial cetoconazol (Frilabo, Porto, Portugal) foi utilizado como controlo positivo.

3.7. Análise Estatística

Os ensaios foram realizados em triplicado e os resultados expressos como valores médios \pm desvio padrão (DP), exceto para o rendimento de extração e atividade antimicrobiana. A média e o desvio padrão foram determinados a partir dos dados tratados e obtidos no Microsoft Excel.

Os testes estatísticos foram realizados usando o software SPSS Statistics (IBM SPSS Statistics for Windows, Versão 23.0. Armonk, NY: IBM Corp.). Os resultados

foram analisados de acordo com a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey com $\alpha = 0,05$. No caso de haver menos de três grupos amostras, os resultados foram analisados utilizando um teste *t*-Student.

4. Resultados e Discussão

4.1. Avaliação de DNA

Os produtos do PCR obtidos pela amplificação dos extratos de DNA de pepininhos-silvestres foram enviados para a STABVIDA (Lisboa, Portugal) para sequenciação de DNA. As sequências obtidas das duas cadeias de DNA foram utilizadas para gerar uma sequência consenso de alta qualidade. Os dados da sequenciação foram analisados e alinhados utilizando o BioEdit v7.2.5 (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, EUA). As sequências obtidas foram as seguintes:

Sequência obtida do extrato de *C. grandis* no estado verde com os *primers* Matk Kim:

```
5'TTGTGTTTACGAGCCAAAGTTTTAACACAAGAAAGGCGAAGTATATATTGGATTTCGATA
CAAATTCCTTTTTTTTTGAGGATCCTCTGTAATAATGAGAAAGATTTCTGGATATACGCACA
AATCGATCAATAATATCAAATCCGACGAATCGATCCAGGTCGTCTTACTAATGGGATGC
CCTAACACGTTACAAAATTCGCTTAGCCAATGATCCAAGCAGAGTAATAATAGGAACT
AGTGTATCGAGTTTCTTCGTAGCATTATCTATTAGAAATGAATTTTCTAACATCTGACTCCA
TACCACTGAAGGATTTAATCGCACACTTGAAATATAGCCCAAAAAGTCAAGAGAACGCTT
GGATAATTGGTTTATATAGATCCTTTCTGGTTGTGACCACACATAAAAAATGACATTGCCAT
AAATTGACAAGGTAATATTTCCACTTATTAACCAGAAGTGGCGTATCTTTTGAACCAGAA
TCGATTTTCCTTGATATCTAACATAATGCATGAAAGGATCCTTGAAGACCCGTAAGATAGC
CGAAAAATAATTAGCAAACACTTTGACAAGATGTTTCGATTTTTCCATAGAAATATATTTCG
TCAAAAAGGACCCTATAAGAAGTTAATCGTATATGAGAAGATTGGTTACGTAGAAAAAGG
AAAATGGATTTCGTATTCACATACATAAGAATTGTATAGGAACAAGACTAATCTTCGATTC
TTTTTGAIAAAGAAAGAAATTTTTTGACGTACTAAGACTATTCAAATTACAATACTC
GTGAAAAAAGAACCGTAATAAATGAAAAGAAGAGGCATCTTTCACCCAGGAGCGAAGGA
TTTGAACCAAGATTTTC-3'
```

Sequência obtida do extrato de *C. grandis* no estado verde com os *primers* rbcL:

```
5'CAAACAGAGACTAAAGCAAGTGTGGATTCAAAGCTGGTGTAAAGATTATAAATTGAC
TTATTATACTCCTGAATATGAAACCAAAGATACTGATATCTTGGCAGCATTCCGAGTAACT
CCTCAACCGGGAGTTCCACCTGAGGAAGCAGGGGCGCTGTAGCTGCTGAATCTTCTACT
GGTACATGGACAACCTGTGTGGACCGATGGGCTTACCAGTCTTGATCGTTACAAAGGACGA
TGCTATGGAATCGAGCCTGTTGCTGGAGAAGAAAATCAATATATTGCTTATGTAGCTTATC
CCTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTA
TTTGGATTCAAGGCTCTACGTGCTCTACGTCTGGAGGATTTGCGARTCCCTACTGCTTATAT
TAAACTTTCCAAGGACCGCCTCATGGTATCCAGGTTGAAAGAGATAAATTGAACAAGTA
TGGTCGCCCTCTATTGGGATGTACTATTAACCAAATTTGGGATTATCCGCTAAGAATTAT
GGTAGAGCAGTTTATGAATGTCTACGCGGTGGA-3'
```

Sequência obtida do extrato de *C. grandis* no estado maduro com os *primers* Matk Kim:

5'TTGTGTTTACGAGCCAAAGTTTTAACACAAGAAAGGCGAAGTATATATTGGATTGATA
 CAAATTCTTTTTTTTTGAGGATCCTCTGTAATAATGAGAAAGATTTCTGGATATACGCACA
 AATCGATCAATAATATCAAAATCCGACGAATCGATCCAGGTCGTCTTACTAATGGGATGC
 CCTAACACGTTACAAAATTTTCGCTTTAGCCAATGATCCAAGCAGAGTAATAATAGGA
 AGTGTATCGAGTTTCTTCGTAGCATTATCTATTAGAAATGAATTTTCTAACATCTGACTCCA
 TACCACTGAAGGATTTAATCGCACACTTGAATATAGCCCAAAAAGTCAAGAGAACGCTT
 GGATAATTGGTTTATATAGATCCTTTCTGGTTGTGACCACACATAAAAAATGACATTGCCAT
 AAATTGACAAGGTAATATTTCCACTTATTAACCAGAAGTGGCGTATCTTTTGAACCAGAA
 TCGATTTTCTTTGATATCTAACATAATGCATGAAAGGATCCTTGAAGACCCGTAAGATAGC
 CGAAAAATAATTAGCAAACACTTTGACAAGATGTTTCGATTTTTCCATAGAAATATATTTCGC
 TCAAAAAGGACCCTATAAGAAGTTAATCGTATATGAGAAGATTGGTTACGTAGAAAAAGG
 AAAATGGATTTCGTATTCACATACATAAGAATTGTATAGGAACAAGACTAATCTTCGATTC
 TTTTTGAAAAAAGAAAGAAATTTTTTTCGACTAAGACTATTCAAATTACAATACTC
 GTGAAAAAAGAACCCTAATAAATGAAAAGAAGAGGCATCTTTCACCCAGGAGCGAAGGA
 TTTGAACCAAGATTTCC-3'

Sequência obtidas do extrato de *C. grandis* no estado maduro com os *primers* rbcL:

5'AAACAGAGACTAAAGCAAGTGTGGATTCAAAGCTGGTGTAAAGATTATAAA
 TTGACTTATTATACTCCTGAATATGAAACCAAAGATACTGATATCTTGGCAGCAT
 TCCGAGTAACTCCTCAACCGGGAGTTCCACCTGAGGAAGCAGGGGCCGCTGTAG
 CTGCTGAATCTTCTACTGGTACATGGACA
 ACTGTGTGGACCGATGGGCTTACCAG
 TCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTATGGAATCGAGCCTGTTTCTGGAGAAGAA
 AATCAATATATTGCTTATGTAGCTTATCCCCTAGACCTTTTTTGAAGAAGGTTCTGT
 TACTAACATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGGATTCAAGGCTCTACGTG
 CTCTACGTCTGGAGGATTTGCGARTCCCTACTGCTTATATTA
 AAAACTTTCCAAGGA
 CCGCCTCATGGTATCCAGGTTGAAAGAGATAAATTGAACAAGTATGGTCGCCCTC
 TATTGGGATGTACTATTAACCAA
 AATTGGGATTATCCGCTAAGAATTATGGTAG
 AGCAGTTTATGAATGTCTACGCGGTGGA-3'

Ao comparar os dados da sequenciação com as bases de dados genéticos (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), é possível verificar que o alinhamento das sequências confirma que os pepininhos avaliados pertencem à espécie *C. grandis* uma vez que todas as sequenciações resultaram em resultados de percentagem de identificação entre 99% e 100%, com *query covers* de 100%.

4.2. Composição Nutricional e Química

Os resultados da análise da composição proximal e valor energético dos frutos *in natura* (imaturos e maduros) de *C. grandis* estão apresentados na **Tabela 2**.

Entre os macronutrientes avaliados, os hidratos de carbono foram os mais abundantes, apresentando teores semelhantes para ambos os estados de maturação, correspondendo a 98,2 e 98,1 g/100 g m.s. (o que equivale a 4,58 e 4,64 g/100 g de m.f.), respectivamente. Os lípidos apresentaram 1,1 g/100 g m.s. (o que equivale a 0,053 g/100

g m.f.) para o estado imaturo e 1,10 g/100 g m.s. (0,050 g/100 g m.f.) para o estado maduro. No entanto, o estado maduro apresentou maiores teores de compostos inorgânicos (cinzas) do que o estado imaturo, com valores de 0,65 g/100 g m.s. (0,031 g/100 m.f) e 0,49 g/100 g m.s. (0,021 g/100 g m.f.), respectivamente. As proteínas apresentaram teores de ~0,2 g/100 g m.s. (~0,01 g/100 g m.f.) para ambos os estados de maturação. Além disso, não houve diferença significativa na percentagem de humidade entre os dois estados de maturação. Para cada 100 g de fruto de *C. grandis* consumido, o potencial energético teórico fornecido é de 403,8 kcal/100 g m.s. (18,9 kcal/100 g m.f.) para frutos imaturos e 402,9 kcal/100g m.s. (19,1 kcal/100 g m.f.) para frutos maduros, tratando-se por isso de um vegetal pouco calórico (**Tabela 2**).

Tabela 2. Composição centesimal dos frutos de *Coccinia grandis*.

Valor Centesimal	Estado Imaturo	Estado Maduro	t-student test p-value
Humidade (% m.f.)	95,3 ± 0,1	95,4 ± 0,1	0,145
Lípidos (g/100g m.s.)	1,1 ± 0,2	1,10 ± 0,08	0,289
Proteínas (g/100g m.s.)	0,194 ± 0,06	0,197 ± 0,001	0,098
Cinzas (g/100g m.s.)	0,49 ± 0,02	0,65 ± 0,01	<0,001
Hidratos de Carbono (g/100g m.s.)	98,2 ± 0,1	98,1 ± 0,1	0,069
Energia (kcal/100g m.s.)	403,8 ± 0,8	402,9 ± 0,3	0,004

m.f.- massa fresco; m.s.- massa seca. Resultados expressos em média±DP, n=3. As diferenças significativas ($p < 0,05$) foram avaliadas pelo teste Student's t-test.

Considerando a literatura disponível até à data, não foi possível encontrar dados detalhados relativos às características centesimais e químicas dos frutos em diferentes estados de maturação de *C. grandis*. A informação encontrada refere-se a uma breve revisão em que é apresentada a composição centesimal de frutos de *C. grandis*, nomeadamente: 1,2 g de proteína, 0,1 g de lípidos e 3,1 g de hidratos de carbono por 100 g do fruto fresco, correspondendo a um valor energético de 18 kcal/100 m.f. (Beera *et al.* (2022). De uma forma geral, estes valores são similares aos encontrados no presente estudo (não foi possível converter para m.s. os resultados encontrados na literatura, assim optamos por incluir entre parêntesis o resultado do nosso estudo em m.f.), apesar de no

presente trabalho o conteúdo em proteína ter sido inferior ao mencionado por Beera *et al.* (2022).

Existindo pouca informação sobre a espécie em estudo, adicionalmente optou-se por tentar comparar os resultados obtidos com os de espécies semelhantes. Um exemplo é o estudo de Siddika *et al.* (2013), em que foram analisados os frutos de *C. cordifolia* em diferentes estágios de maturação. Os frutos em ambos os estados de maturação apresentaram um valor de humidade muito elevado, como seria expectável, sendo, contudo, superior nos frutos imaturos (91,98%) comparado com os maduros (87,14%). Quanto aos macronutrientes, os frutos imaturos desta espécie continham 2,58 g de proteína, 1 g de cinzas, 0,2 g lípidos enquanto os frutos maduros continham 7,37 g de proteína, 1,68 g de cinzas e 0,22 g de lípidos por 100 g de m.f. (não foi possível converter para m.s. estes resultados). Comparando com a espécie mais conhecida e consumida de pepinos, *Cucumis sativus* L., cuja composição nutricional consiste em 95% de água, 0,1% de lípidos, 0,6% de proteínas e 2,2% de hidratos de carbono por 100 g de fruto fresco (Uthpala *et al.*, 2020), observa-se igualmente uma grande similaridade entre os resultados obtidos para a espécie *C. grandis* em estudo.

Como referido na seção de material e métodos, para além do valor nutricional, neste trabalho procedeu-se ainda à análise detalhada da composição de açúcares livres, ácidos orgânicos e ácidos gordos. Os açúcares são hidratos de carbono que fornecem energia ao corpo humano. Nas plantas, eles são produzidos por meio do processo de fotossíntese. Eles são divididos em dois tipos: açúcares simples, que incluem monossacarídeos como glicose e frutose, assim como dissacarídeos como sacarose e lactose. Esses açúcares simples são facilmente absorvidos pelo organismo. Os açúcares complexos, como amido, levam mais tempo para serem quebrados e absorvidos. Além de fornecer energia, alguns açúcares também desempenham funções importantes na síntese de outras moléculas, como proteínas e ácidos nucleicos (Shah *et al.*, 2019; *World Health Organization*, 2015).

De acordo com a **Tabela 3**, foram identificados e quantificados dois monossacarídeos - frutose e glucose - e um dissacarídeo, a sacarose, que é formada pela união de uma molécula de glucose e outra de frutose. A frutose foi o açúcar com a maior quantidade, sendo que no estado maduro a quantidade foi maior do que no estado imaturo (26,8 mg/100 g m.s. e 18,0 mg/100 g m.s., respetivamente), seguido pela glucose (22,6

mg/100 g m.s. e 14,2 mg/100 g m.s.) e pôr fim a sacarose, a qual apresentou maior quantidade estado imaturo do que no maduro (2,0 mg/100 g m.s. e 0,61 mg/100 g m.s., respetivamente). Como se pode verificar, os pepininhos vermelhos apresentaram maior quantidade de açúcares totais do que os pepininhos verdes. De facto, os frutos verdes geralmente apresentam uma quantidade menor de açúcares totais em relação aos frutos maduros. Esse acúmulo de açúcares nos frutos maduros é resultado de diversas mudanças bioquímicas e fisiológicas que ocorrem durante o processo de amadurecimento. Entre as modificações, destacam-se a quebra do amido em açúcares simples, as alterações na parede celular e a redução da atividade fotossintética. Tais fatores levam ao aumento dos açúcares totais nos frutos maduros, o que lhes confere o sabor adocicado e a textura suave característicos (Patrick *et al.*, 2012). Siddika *et al.* (2013) avaliou os açúcares totais nos frutos frescos de *C. cordifolia* obtendo resultados superiores nos frutos maduros (1,55 %) do que nos imaturos (0,89 %).

Tabela 3. Composição em açúcares livres dos frutos de *Coccinia grandis*

Açúcares livres (g/100g m.s.)	Estado Imaturo	Estado Maduro	<i>t</i> -student test <i>p</i> -value
Frutose	18 ± 1,0	26,8 ± 0,7	<0,001
Glucose	14,2 ± 0,8	22,6 ± 0,1	<0,001
Sacarose	2,00 ± 0,04	0,61 ± 0,01	<0,001
Total	34 ± 2,0	49,9 ± 0,7	<0,001

m.s. – Massa seca. Resultados expressos em média±DP, *n*=3. As diferenças significativas (*p* < 0,05) foram avaliadas pelo teste Student's *t*-test.

Os ácidos orgânicos são importantes na produção de energia em seres vivos, atuam como intermediários no metabolismo de hidratos de carbono, lípidos e proteínas (Rinaldo, 2008). São muito valorizados como conservantes de alimentos, pois são considerados ingredientes alimentares, podem ser produzidos por microrganismos e também são constituintes naturais de plantas e tecidos animais. Como resultado, são normalmente utilizados como acidulantes, conservantes, pois alguns controlam a contaminação microbiana, aditivos de sabor e como agentes reguladores de acidez em alimentos e bebidas (Theron & Lues, 2010). Os resultados da composição dos ácidos orgânicos dos frutos da *C. grandis* estão apresentados na **Tabela 4**.

Tabela 4. Composição em ácidos orgânicos dos frutos de *Coccinia grandis*

Ácidos Orgânicos (g/100g m.s.)	Estado Imaturo	Estado Maduro	t-student test p-value
Ácido Oxálico	2,25 ± 0,03	2,26 ± 0,01	0,318
Ácido Quínico	2,25 ± 0,06	0,55 ± 0,01	< 0,001
Ácido Málico	1,8 ± 0,1	0,42 ± 0,01	< 0,001
Ácido Ascórbico	v	v	-
Ácido Chiquímico	0,13 ± 0,01	v	-
Ácido Cítrico	0,9 ± 0,1	0,61 ± 0,01	< 0,001
Ácido Succínico	3,9 ± 0,1	5,01 ± 0,01	< 0,001
Ácido Fumárico	v	v	-
Total	11,10 ± 0,02	8,84 ± 0,01	< 0,001

v- vestígios. Resultados expressos em média±DP, n=3. As diferenças significativas ($p < 0,05$) foram avaliadas pelo teste Student's *t*-test.

Foram detetados os ácidos oxálico, quínico, málico, chiquímico, cítrico e succínico, obtendo um total de ácidos orgânicos de 11,1 g por 100 g m.s. de fruto verde e 8,84 g por 100 g m.s. de fruto maduro. Isso pode ser explicado, porque durante o processo de desenvolvimento dos frutos, há uma relação inversa entre os níveis de ácidos orgânicos e os níveis de açúcar. Durante a fase de amadurecimento, os açúcares acumulam-se à medida que ocorre a degradação do amido, enquanto os níveis de ácidos orgânicos que se acumularam nos frutos jovens diminuem significativamente (Batista-Silva *et al.*, 2018).

O ácido succínico apresentou a maior quantidade em ambos os estados de maturação, com uma presença mais significativa no estado maduro (5,01 g/100 g m.s.) do que no estado verde (3,9 g/100 g m.s.). O ácido succínico é uma substância orgânica de fórmula $C_4H_6O_4$, que pode ser encontrado naturalmente em alguns tipos de frutas e verduras, mas também pode ser sintetizado a partir dos ácidos málico e anidrido málico. Na indústria alimentar, esse ácido é utilizado como conservante e aditivo de sabor, além de poder ser empregado na produção de medicamentos e corantes. Devido às suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, vem sendo objeto de estudo na prevenção e tratamento de doenças crônicas como diabetes e artrite (Zeikus *et al.*, 1999; Pari &

Saravanan, 2007). O ácido chiquímico, por sua vez, somente foi detectado no estado verde e apresentou a menor concentração (0,13 g/100 g m.s.). Em relação ao ácido ascórbico e fumárico, foram detectados apenas conteúdos vestigiais, com uma quantidade insuficiente para a caracterização e quantificação. Até ao momento, há poucos dados detalhados disponíveis sobre a quantificação de ácidos orgânicos em frutos de *C. grandis*.

No que respeita os ácidos gordos presentes nos frutos da *C. grandis*, foram identificados 15 tipos diferentes os quais se encontram apresentados na **Tabela 5**. Para os frutos imaturos, os ácidos gordos polinsaturados (PUFA) foram o grupo predominante, seguidos pelos ácidos gordos saturados (SFA) e, por último, os ácidos gordos monoinsaturados (MUFA). No caso dos frutos maduros, os ácidos gordos saturados (SFA) foram encontrados em maior quantidade, seguidos pelos ácidos gordos polinsaturados (PUFA) e, por fim, os ácidos gordos monoinsaturados (MUFA). Em geral, é recomendada a ingestão dos três tipos de ácidos gordos, porém é importante observar que o consumo excessivo de ácidos gordos saturados pode aumentar o risco de doenças cardiovasculares, enquanto o consumo de PUFA pode ajudar a reduzir esse risco. Alimentos como carnes gordurosas e produtos lácteos são fontes de gorduras saturadas e devem ser consumidos com moderação. Por outro lado, o consumo de peixes, nozes, sementes e azeite são fontes de gorduras polinsaturadas e são benéficos para a saúde, especialmente para a saúde cardiovascular. Os ácidos gordos ómega-3 e ómega-6 são essenciais para o bom funcionamento do corpo humano, o que significa que eles não são produzidos pelo corpo humano e devem ser ingeridos por meio da alimentação (Djuric & Calder, 2021; Yamagata, 2023).

Os pepininhos verdes são uma excelente fonte de ácido linoleico (C18:2n6c), que representa a maior proporção (34,7%) dos ácidos gordos presentes. Isso os torna uma boa fonte de ácidos gordos ómega-6, cujo consumo pode auxiliar na redução do colesterol LDL, conseqüentemente diminuir o risco de doenças cardiovasculares (Djuric & Calder, 2021). Além disso, os pepininhos contêm uma alta quantidade (22,74%) de ácido alfa-linolénico (C18:3n3), um ácido gordo ómega-3 que traz benefícios à saúde para quem o consome. Porém, é importante observar que os pepininhos também possuem uma elevada quantidade (25,1%) de ácido palmítico (C16:0), um ácido gordo saturado que, quando consumido em excesso, pode contribuir para o aumento do risco de doenças cardiovasculares e dos níveis de colesterol no sangue. No entanto, quando consumido com moderação, o ácido palmítico pode ser considerado uma fonte de energia para o

corpo humano (Lima *et al.*, 2000). Considerando o baixo teor de lípidos nos frutos de *C. grandis*, apesar de o teor relativo de SFA ser elevado, o seu potencial impacto negativo para a saúde é expectável ser muito reduzido.

Tabela 5. Composição em ácidos gordos dos frutos de *Coccinia grandis*

Ácidos Gordos (%)	Estado Imaturo	Estado Maduro	<i>t</i> -student test <i>p</i> -value
C12:0	0,39 ± 0,03	1,45 ± 0,04	<0,001
C13:0	0,16 ± 0,01	0,19 ± 0,01	<0,001
C14:0	0,72 ± 0,02	2,57 ± 0,01	<0,001
C15:0	0,55 ± 0,01	0,69 ± 0,01	<0,001
C16:0	25,1 ± 0,2	32,22 ± 0,02	<0,001
C16:1	0,58 ± 0,05	0,85 ± 0,03	<0,001
C17:0	0,45 ± 0,04	0,92 ± 0,01	<0,001
C18:0	6,53 ± 0,02	7,04 ± 0,03	<0,001
C18:1n9c	3,98 ± 0,06	4,2 ± 0,3	0,006
C18:2n6c	34,7 ± 0,01	24,0 ± 0,1	<0,001
C18:3n3	22,74 ± 0,06	19,5 ± 0,7	<0,001
C20:0	0,99 ± 0,01	1,2 ± 0,1	<0,001
C22:0	1,16 ± 0,9	1,74 ± 0,01	<0,001
C23:0	0,61 ± 0,05	0,90 ± 0,06	<0,001
C24:0	1,39 ± 0,06	2,5 ± 0,2	<0,001
SFA	38,01 ± 0,02	51,4 ± 0,3	<0,001
MUFA	4,6 ± 0,1	5,1 ± 0,3	<0,001
PUFA	57,42 ± 0,08	43,5 ± 0,6	<0,001

Resultados expressos em média ± DP, *n*=3. C12:0 – ácido láurico; C13:0 – ácido tridecílico; C14:0 – ácido mirístico; C15:0 – ácido pentadecílico; C16:0- ácido palmítico; C16:1 – palmitoléico; C17:0 – ácido margárico; C18:0 – ácido esteárico; C18:1n9c – ácido oleico; C18:2n6c – ácido linoleico; C18:3n3 – ácido linolênico; C20:0 – ácido arachídico; C22:0- ácido beênico; C23:0 – ácido ticosanóico; C24:0 – ácido lignocérico; SFA- Ácidos gordos saturados; MUFA- Ácidos gordos monoinsaturados; PUFA- Ácidos gordos polinsaturados. As diferenças significativas (*p* < 0,05) foram avaliadas pelo teste Student's *t*-test.

A composição de ácidos gordos nos pepininhos vermelhos apresentou semelhanças em relação aos valores encontrados nos pepininhos verdes, no entanto, o

ácido gordo predominante foi o ácido palmítico (C16:0), com uma percentagem de 32,22%. Assim como os pepininhos verdes, os pepininhos vermelhos também apresentaram teores elevados de ácidos gordos ômega-3 e ômega-6 (19,5% e 24%, respectivamente). Ao comparar os dois estágios de maturação, conclui-se que os pepininhos verdes apresentam uma composição em ácidos gordos mais benéfica para a saúde.

De modo geral, os frutos verdes possuem maiores concentrações de PUFAs, enquanto os frutos maduros apresentam maiores concentrações de SFAs. As mudanças da composição dos ácidos gordos durante o amadurecimento são comuns e podem ocorrer por diversas razões, uma das explicações é que ácidos gordos insaturados são mais suscetíveis a oxidação do que os saturados, o que pode levar a perda de ácidos gordos insaturados e assim aumentar a concentração dos ácidos gordos saturados nos frutos maduros. Outra explicação é que as enzimas que sintetizam os ácidos gordos podem ser reguladas de forma diferente durante o processo de amadurecimento, resultando em uma produção maior ou menor de diferentes tipos de ácidos gordos (Dala-Paula, 2021).

Os tocoferóis são compostos orgânicos classificados como antioxidantes lipossolúveis pertencentes à família da vitamina E. Eles são divididos em quatro formas principais: α -tocoferol, β -tocoferol, γ -tocoferol e δ -tocoferol, além dos tocotrienóis, que podem ser encontrados numa variedade de alimentos, incluindo nozes, sementes, verduras de folhas verdes e cereais integrais. Os tocoferóis possuem a capacidade de neutralizar os radicais livres, moléculas instáveis que podem causar danos às células do corpo humano. Além disso, eles desempenham um papel importante na saúde cardiovascular, no sistema imunológico e na saúde da pele. Nos alimentos auxiliam também na estabilização dos ácidos gordos, prevenindo a rancificação durante o armazenamento (Dala-Paula, 2021).

Relativamente aos tocoferóis presentes nas amostras de *C. grandis*, foram identificados o α -, β - e γ -tocoferóis em ambos os estados de maturação, sendo o δ -tocoferol identificado somente no estado maduro, tais resultados estão dispostos na **Tabela 6**. O α -tocoferol revelou ser o tocoferol maioritário em ambos os estados de maturação (verde: 19,9 mg /100 g m.s.; vermelho: 8,33 mg/100 g m.s.) sendo o β -tocoferol (0,55 mg/100 g m.s.) o minoritário no pepininho verde e o δ -tocoferol (0,46 mg/100 g m.s.) o minoritário no pepininho vermelho.

Todas as formas de vitamina E possuem propriedades antioxidantes e são importantes para a saúde do corpo humano, no entanto, o α -tocoferol é a forma mais ativa da vitamina E e tem a maior disponibilidade biológica, o que significa que é mais facilmente absorvido e utilizado pelo corpo. Isso ocorre porque α -tocoferol é transportado no sangue por uma proteína específica, chamada de proteína de transferência de alfa-tocoferol (TTP), que é responsável por levar a vitamina E para os tecidos que mais precisam dela. Outro fator que pode contribuir para a maior absorção do α -tocoferol é a sua estrutura química única, que permite que ele seja mais facilmente incorporado nas membranas celulares (Institute of Medicine, 2000).

Tabela 6. Composição em tocoferóis dos frutos de *Coccinia grandis*

	Estado Imaturo	Estado Maduro	<i>t</i> -student test <i>p</i> -value
Tocoferóis (mg/100 g m.s.)			
α -Tocoferol	19,9 \pm 0,6	8,33 \pm 0,07	<0,001
β -Tocoferol	0,55 \pm 0,01	0,73 \pm 0,02	<0,001
γ -Tocoferol	0,90 \pm 0,03	1,36 \pm 0,04	<0,001
δ -Tocoferol	nd	0,46 \pm 0,03	-
Total	21,4 \pm 0,7	10,9 \pm 0,1	<0,001

Resultados expressos em média \pm DP, *n*=3. As diferenças significativas (*p* < 0,05) foram avaliadas pelo teste Student's *t*-test. nd= não detectado.

Foram determinados ainda, os carotenoides totais dos frutos da *C. grandis* nos dois estados de maturação, sendo os resultados obtidos apresentados na **Tabela 7**. Os carotenoides são compostos coloridos encontrados em vegetais, que podem ser divididos em carotenos e xantofilas. São sensíveis à luz, temperatura, acidez e oxidação. Existem mais de 600 tipos de carotenoides, sendo cerca de 50 precursores da vitamina A. O β -caroteno é o mais comum e ativo. Além disso, os carotenoides apresentam ação protetora contra o cancro, realizando diversas funções como o sequestro de radicais livres e aumento da resposta imune (Ambrósio *et al.*, 2006).

Embora a presença de carotenoides esteja relacionada com os alimentos de cor laranja, amarela e vermelha, também podem ser encontrados em alimentos verdes, porém em menor quantidade. As hortaliças verdes, folhosas ou não, possuem luteína, β -caroteno,

violaxantina e neoxantina como os principais destes compostos. Os carotenoides estão presentes nos cloroplastos das hortaliças verdes e não estão esterificados. As clorofilas não fazem parte dos carotenoides, mas compartilham de propriedades antioxidantes e benéficas para a saúde (Rodriguez- Amaya *et al.*, 2008).

Em relação aos resultados obtidos, os frutos maduros de *C. grandis* apresentam maior teor de carotenoides totais expressos em β -caroteno (257 $\mu\text{g/g}$ m.s.) do que os frutos imaturos (100 $\mu\text{g/g}$ m.s.). Isso pode ser explicado, porque durante o processo de amadurecimento dos frutos, as enzimas tornam-se mais ativas e convertem os precursores de carotenoides em formas ativas, o que aumenta a sua quantidade de nos frutos. Além disso, o amadurecimento faz com que as membranas celulares fiquem mais permeáveis, permitindo uma maior absorção e acúmulo de carotenoides nos tecidos do fruto (Rodriguez-Amaya *et al.*, 2008).

Tabela 7. Teor de carotenoides totais dos frutos de *Coccinia grandis*

	Estado Imaturo	Estado Maduro	<i>t</i> -student test <i>p</i> -value
Carotenoides totais ($\mu\text{g/g}$ m.s.)*	100 \pm 3	257 \pm 22	<0,001

*Resultados expressos em média \pm DP, $n=3$, expressos em $\mu\text{g/g}$ de β -Caroteno. As diferenças significativas ($p < 0,05$) foram avaliadas pelo teste Student's *t*-test.

Os estudos sobre carotenoides em frutos de *C. grandis* são escassos, sendo assim, a literatura carece também da comparação dos teores de carotenoides nos diferentes estados de maturação da espécie. O estudo realizado por Beera *et al.* (2022), indicam que os frutos de *C. grandis*, de um modo geral, apresentam em torno de 4,036 $\mu\text{g/g}$ m.f. expressos em β -caroteno, um valor similar ao encontrado neste trabalho (100 $\mu\text{g/g}$ m.s. equivalem a 4,66 $\mu\text{g/g}$ m.f.).

A partir dos valores obtidos, é possível comparar os frutos da *C. grandis* com outros alimentos ricos em carotenoides. Pacheco *et al.* (2014) analisaram alguns alimentos no estado de maturação maduro como fontes destes compostos e obtiveram os resultados que estão apresentados na **Tabela 8**. Ao comparar os resultados obtidos para os pepininhos silvestres conclui-se que a espécie *C. grandis* apresenta quantidades elevadas desses compostos. De facto, os teores de carotenoides totais são superiores aos reportados para o tomate (43,0 $\mu\text{g/g}$ m.s) e melancia (56,0 $\mu\text{g/g}$ m.s.). Além disso, no

estágio imaturo, os pepininhos apresentam teores similares aos da cenoura (110,0 µg/g m.s.), enquanto no estágio maduro os teores são superiores aos da abóbora (212,0 µg/g m.s.). Comparativamente, isso faz dos frutos da *C. grandis* uma boa fonte de carotenoides. No entanto, é importante destacar que análises mais criteriosas, como a quantificação dos diferentes tipos de carotenoides, são necessárias para uma avaliação mais completa da composição.

Tabela 8. Teor de carotenoides totais em alimentos fonte de carotenoides (adaptado de Pacheco *et al.*, 2014)

Alimentos fontes de carotenoides	Carotenoides totais (µg/g m.s.)
Cenoura (<i>Daucus carota</i> L.)	110 ± 1
Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.)	43 ± 1
Abóbora (<i>Curcubita moschatta</i> Duch)	212 ± 3
Melancia (<i>Citrullus lanatus</i>)	56 ± 1

Resultados expressos em média±DP.

A análise de compostos fenólicos nos extratos de *C. grandis* por HPLC-DAD-(ESI) MS/MS mostrou a presença de um total de 23 compostos diferentes, incluindo isômeros, separados em 16 picos (**Tabela 9, Figuras 7 e 8**).

De entre os polifenóis encontrados nos extratos, 14 foram identificados como ácidos fenólicos e seus derivados, principalmente glicosilados. Os ácidos protocatecuico (pico 2b), clorogénico (pico 3a), hidroxibenzóico (pico 6a) e ferúlico (pico 7) foram identificados através da comparação dos tempos de retenção e características espectroscópicas com padrões de referência disponíveis. Os derivados glicosídeos do ácido *p*-coumárico (pico 1a, [M-H]⁻ de *m/z* 324), sinápico (picos 2a e 6b, [M-H]⁻ de *m/z* 385), cafeico (pico 3b, [M-H]⁻ de *m/z* 341), e ferúlico (pico 5b, [M-H]⁻ de *m/z* 355) apresentaram íons fragmento no espectro MS₂ que correspondem a perda neutra de um resíduo de hexose (-162 u). O composto do pico 1b apresentou íão molecular [M-H]⁻ de *m/z* 417 e íão fragmento de *m/z* 152 correspondendo à perda de 2 unidades de pentose (132 u) formando a molécula do ácido dihidroxibenzoico. Além disso, nos espectros de massas dos isômeros do ácido coumaroilquínico, a quebra do íão molecular de *m/z* 337

gerou os fragmentos de m/z 163 [ácido *p*-coumárico-H]⁻ e 191 [ácido quínico-H]⁻, este último como pico base.

Além dos ácidos fenólicos, o perfil de compostos fenólicos dos extratos de *C. grandis* foi caracterizado pela presença de 9 flavonoides glicosídeos, com destaque para os derivados de quercetina e kaempferol. Os compostos quercetina-3-*O*-rutinosídeo (rutina, pico 12) e kaempferol-3-*O*-rutinosídeo (pico 16) tiveram identificação confirmada pelos padrões autênticos, com os quais compartilharam tempo de retenção e características espectrais UV-Vis e de massas. Os restantes compostos apresentaram pico base no espectro MS² característico da aglicona do flavonoide após a perda neutra de resíduos de pentose (-132 u) e hexose (-162 u), além do deoxi-açúcar ramnose (-146 u).

Relativamente ao estado de maturação dos pepininhos, os perfis de compostos fenólicos entre os extratos obtidos pelas diferentes técnicas e procedimentos de extração foram bastante similares (**Figura 7** e **8** para pepininhos verdes e maduros, respetivamente). No entanto, ao compararmos os perfis entre os pepininhos verdes e maduros, é possível notar diferenças principalmente no que se refere à grande presença de derivados dos ácidos cafeoilquínico e coumaroilquínico (picos 3 e 8) nos primeiros, enquanto no estado maduro os flavonoides são os compostos mais notáveis (a partir da metade do cromatograma, **Figuras 7** e **8**). De facto, em termos quantitativos (**Tabela 10**), é possível notar que os ácidos fenólicos perfizeram cerca de um terço do teor total de compostos fenólicos nos extratos de pepininhos verdes, enquanto nos maduros esta classe de compostos representou uma parcela relativa muito menor do perfil.

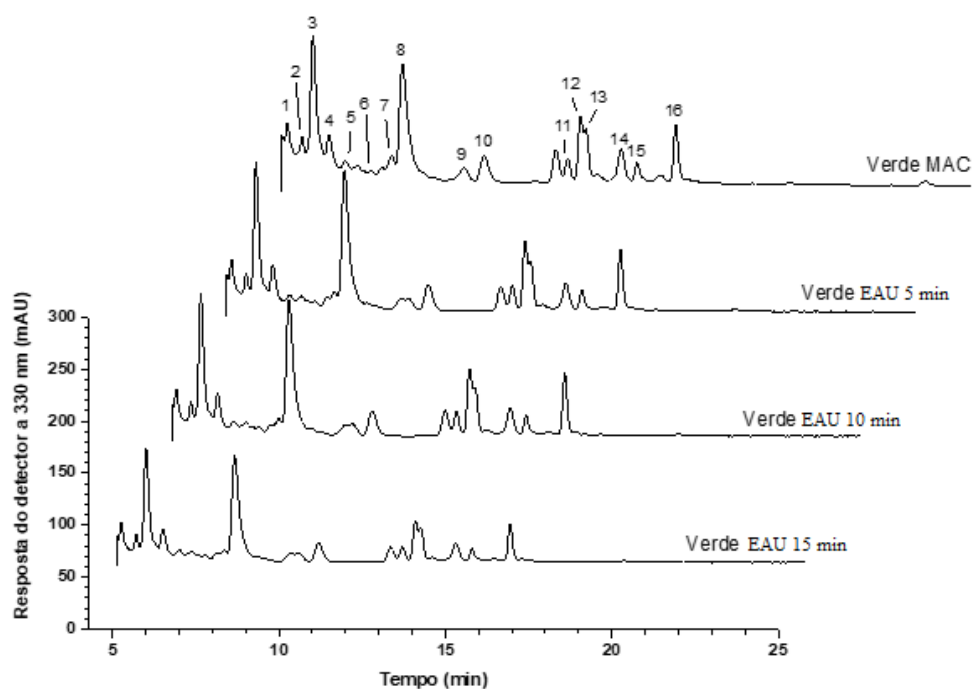


Figura 7. Cromatogramas, obtidos por HPLC-DAD, dos compostos fenólicos de extratos de *Coccinia grandis* no estado verde de maturação, preparados por EAU e extração convencional (maceração). Os cromatogramas foram processados a 330 nm. A caracterização dos picos é mostrada na Tabela 9.

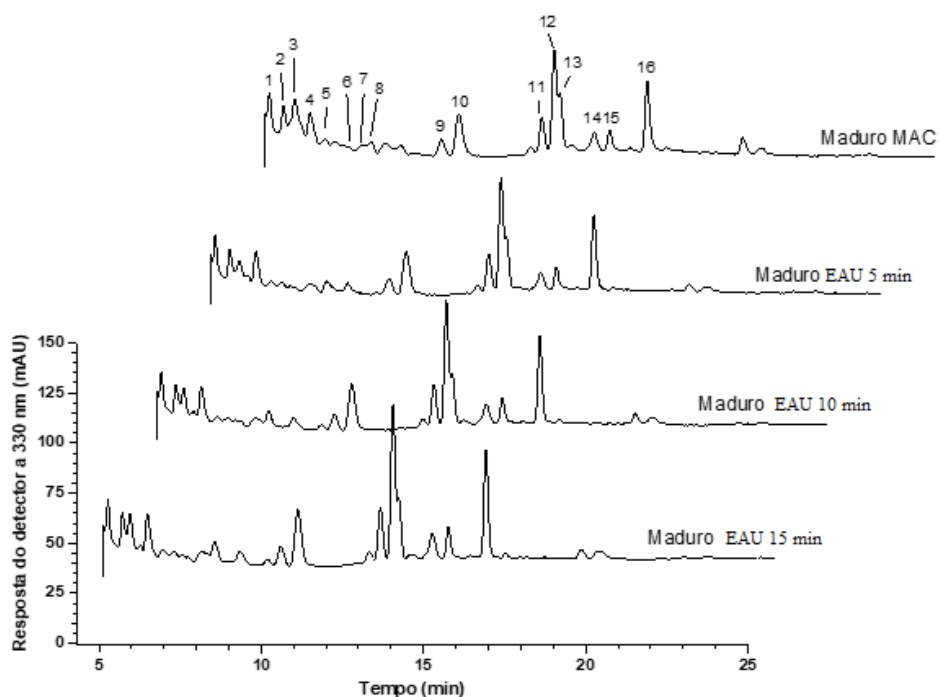


Figura 8. Cromatogramas, obtidos por HPLC-DAD, dos compostos fenólicos de extratos de *Coccinia grandis* no estado maduro de maturação, preparados por EAU e extração convencional (maceração). Os cromatogramas foram processados a 330 nm. A caracterização dos picos é mostrada na Tabela 9.

Independente do estado de maturação, a rutina (quercetina-3-*O*-rutinosídeo) foi o composto mais recuperado dos pepininhos e mais abundante, com valores de $0,51 \pm 0,01$ mg/g de extrato de pepininho maduro obtido por ultrassom com 15 min de extração. No geral, as amostras apresentaram baixos teores de fenólicos totais (obtidos pelo somatório dos compostos individuais quantificados por HPLC-DAD). O pepininho verde apresentou teores maiores de compostos fenólicos que o maduro, independentemente do método ou tempo de extração. Em relação aos métodos, os valores de polifenóis recuperados através da extração assistida por ultrassom também excederam constantemente os teores recuperados pela maceração, indicando o potencial deste método verde, rápido, para a obtenção de biomoléculas de fontes naturais.

Os autores Kondhare e Lade (2017), identificaram pela análise de GC-MS 17 compostos diferentes em extratos metanólicos de frutos verdes de *C. grandis*, os resultados obtidos indicam a presença de alcalóides e compostos fenólicos, sendo o maioritário o β -sitoesterol (58%).

No estudo realizado por Astiti *et al.* (2021), foram avaliados extratos metanólicos das folhas de *C. grandis*. Através da análise LC-MS/MS, identificaram-se 32 compostos presentes nos extratos metanólicos. Esses compostos foram caracterizados pela presença predominante de compostos fenólicos, alcaloides e flavonoides. Entre eles, destacam-se a rutina, o kaempferol-3-*O*-rutinosídeo e a quercetina-3-*O*-rutinosídeo. Ao comparar os extratos das folhas com os extratos dos frutos, é possível observar semelhanças entre os compostos identificados no que diz respeito aos compostos fenólicos.

Tabela 9. Perfil cromatográfico e espectroscópico dos compostos fenólicos dos extratos de *Coccinia grandis*

Pico ^a	Tr ^b (min)	Tentativa de Identificação	λ _{max} ^c (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	MS ² (m/z)
1a	4.44-4.51	Hexósido de ácido <i>p</i> -cumárico	287	324	163, 145
1b		Ácido dihidroxibenzóico-dipentosídeo		417	152, 108
2a	4.78-4.8	Hexósido de ácido sinápico	261, 295	385 (aduto 431)	223, 179, 153, 164
2b		Ácido protocatecuico		153	135
3a	5.13-5.25	Ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquínico (ácido clorogénico)	299, 325	353	191, 179, 173, 135
3b		Hexósido de ácido cafeico		341	179, 161
4	5.67-5.70	Ácido feruloilquínico	294, 320	367	193, 191, 173 134, 93
5a	6.19-6.22	Cafeoil triptofano	280	365	203
5b		Hexósido de ácido ferúlico		355	193, 179, 149, 134
6a	6.91-6.92	Ácido hidroxibenzóico	256	137	93
6b		Isómero do hexósido do ácido sinápico		385	223, 179, 153, 164
7	7.3- 7.4	Ácido ferúlico	nd	179	135
8	7.74-7.85	Ácido <i>cis</i> 4- <i>O</i> - <i>p</i> -Cumaroilquínico	311	337	191,163,119
9	9.78-9.80	Quercetina pentosil-rutinosídeo	256, 355	741	609, 300, 271, 255, 179, 151
10a	10.3-10.35	Isómero de quercetina pentosil-rutinosídeo	267, 290, 354	741	609, 300, 271, 255, 179, 151
10b		Ácido <i>trans</i> 4- <i>O</i> - <i>p</i> -Cumaroilquínico		337	191,163,119
11a	12.80-12.85	Quercetina-3- <i>O</i> -rutinosídeo	265, 351	609	300, 271, 255, 179, 151
11b		Isómero Kaempferol <i>O</i> -pentosil-ramnosil-hexosídeo		725	285, 255, 227
12	13.23-13.26	Isómero de Quercetina-3- <i>O</i> -rutinosídeo	258, 354	609	300, 271, 255, 179, 151
13	13.37-13.42	Isómero Kaempferol <i>O</i> -pentosil-ramnosil-hexosídeo	267, 313, 360 (sh)	725	593, 285, 255, 227

Pico ^a	Tr ^b (min)	Tentativa de Identificação	λ_{max} ^c (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	MS ² (m/z)
14	14.45-14.48	Eriodictiol hexosídeo	290, 324	449	269, 225, 209, 165
15	14.93-14.96	Kaempferol-3- <i>O</i> -rutinosídeo	266, 291, 349	593	285, 255, 226
16	16.11-16.12	Isómero Kaempferol-3- <i>O</i> -rutinosídeo	266, 347	593	285, 255, 227

Mais de uma linha por pico indica coeluição. ^a Picos numerados de acordo com a Figura 7. ^b Tempo de retenção em coluna C18. ^c Comprimento de onda de máxima absorção no gradiente de água acidificada (0,1% ácido fórmico) e acetonitrilo. Devido a coeluições e baixas concentrações dos compostos, o espectro UV-Vis pode não refletir o característico do composto puro.

Tabela 10. Compostos fenólicos individuais, por classes e totais nos extratos de *Coccinia grandis*

Pico	Identificação tentativa	Imaturo			Maduro			Imaturo	Maduro
		EAU 5	EAU 10	EAU 15	EAU 5	EAU 10	EAU 15	MAC	MAC
1a	hexósido de ácido <i>p</i> -cumárico	0,07 ± 0,01b	v	0,07 ± 0,01b	0,12 ± 0,01a	0,05 ± 0,01c	0,02 ± 0,01d	0,01 ± 0,01e	v
1b	Ácido diidroxibenzóico-dipentosídeo								
2a	Hexósido de ácido sinápico	0,26 ± 0,01a	0,24 ± 0,01b	0,22 ± 0,01c	v	v	v	0,12 ± 0,01d	v
2b	Ácido protocatecuico								
3a	Ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquínico (ácido clorogénico)	0,25 ± 0,01a	0,24 ± 0,01a	0,19 ± 0,01b	0,03 ± 0,01c	0,03 ± 0,01c	0,03 ± 0,01c	v	0,025 ± 0,01d
3b	Hexósido de ácido cafeico								
4	Ácido feruloilquínico	v	v	v	v	v	v	v	v
5a	Cafeoil triptofano	0,04 ± 0,01a	0,04 ± 0,01a	0,04 ± 0,01a	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01b	0,04 ± 0,01a	0,04 ± 0,01a	0,04 ± 0,01a
5b	Hexósido de ácido ferúlico								
6a	Ácido hidrobenczoico	0,27 ± 0,01a	0,24 ± 0,01b	0,11 ± 0,01c	v	v	0,01 ± 0,01d	0,009 ± 0,01d	v
6b	Isómero do hexósido do ácido sinápico								

Pic o	Identificação tentativa	Imaturo			Maduro			Imaturo	Maduro
		EAU 5	EAU 10	EAU 15	EAU 5	EAU 10	EAU 15	MAC	MAC
7	Ácido ferulico	v	v	v	v	v	v	v	v
8	<i>cis</i> 4- <i>O-p</i> - Ácido cumaroilquínico	0,09 ± 0,01a	0,09 ± 0,01a	0,05 ± 0,01b	v	v	v	v	v
9	Quercetina pentosil-rutinosídeo	0,21 ± 0,01c	0,21 ± 0,01c	0,21 ± 0,01c	0,24 ± 0,01a	0,24 ± 0,01a	0,24 ± 0,01a	0,24 ± 0,01a	0,22 ± 0,01b
10a	Isómero de quercetina pentosil-rutinosídeo	0,35 ± 0,01a,b	0,34 ± 0,01b	0,31 ± 0,01c	0,32 ± 0,01c	0,33 ± 0,01c	0,36 ± 0,01a	0,28 ± 0,01d	0,26 ± 0,01e
10b	Ácido <i>trans</i> 4- <i>O-p</i> -Cumaroilquínico								
11a	Quercetina-3- <i>O</i> -rutinosídeo	0,27 ± 0,01b,c	0,27 ± 0,01b,c	0,24 ± 0,01d	0,27 ± 0,01b,c	0,28 ± 0,01b	0,30 ± 0,01a	0,23 ± 0,01d,e	0,23 ± 0,01d,e
11b	Isómero Kaempferol <i>O</i> -pentosil-ramnosil-hexosídeo								
12	Isómero de Quercetina-3- <i>O</i> -rutinosídeo	0,22 ± 0,01f	0,46 ± 0,01b	0,35 ± 0,01d	0,43 ± 0,01c	0,45 ± 0,01b	0,51 ± 0,01a	v	0,30 ± 0,01e
13	Isómero Kaempferol <i>O</i> -pentosil-ramnosil-hexosídeo	0,16 ± 0,01a,b	0,17 ± 0,01a	0,12 ± 0,01c	0,08 ± 0,01e	0,08 ± 0,01e	0,10 ± 0,01d	v	0,04 ± 0,01f
14	Eriodictiol hexosídeo	0,07 ± 0,01a	0,07 ± 0,01a	0,048 ± 0,01b	0,02 ± 0,01c,d	0,03 ± 0,01c	0,03 ± 0,01c	0,04 ± 0,01b	0,01 ± 0,01d
15	Kaempferol-3- <i>O</i> -rutinosídeo	0,06 ± 0,01a	0,06 ± 0,01a	0,03 ± 0,01c	0,03 ± 0,01c	0,04 ± 0,01b,c	0,05 ± 0,01b	v	0,01 ± 0,01d
16	Isómero Kaempferol-3- <i>O</i> -rutinosídeo	0,25 ± 0,01a	0,25 ± 0,01a	0,14 ± 0,01e	0,16 ± 0,01d	0,18 ± 0,01c	0,23 ± 0,01b	0,11 ± 0,01f	0,07 ± 0,01g
	Ácidos fenólicos e seus derivativos	0,98 ± 0,01a	0,81 ± 0,01b	0,68 ± 0,01c	0,18 ± 0,01e	0,11 ± 0,01f	0,09 ± 0,01g	0,39 ± 0,01d	0,06 ± 0,01h
	Flavonoides e seus derivativos	1,60 ± 0,01b	1,83 ± 0,01a	1,46 ± 0,01c	1,55 ± 0,01b	1,61 ± 0,01	1,81 ± 0,01a	1,33 ± 0,01d	1,13 ± 0,01e
	Compostos fenólicos totais	2,58 ± 0,01b	2,64 ± 0,01a	2,14 ± 0,01c	1,74 ± 0,01e	1,73 ± 0,01e	1,91 ± 0,01d	1,72 ± 0,01e	1,19 ± 0,01f

Os dados quantitativos são expressos em mg/g de extrato. EAU- Extração Assistida por Ultrassom, onde 5, 10 e 15 correspondem ao tempo de extração em min. MAC- maceração; v- vestígios. Letras diferentes na mesma coluna mostram diferenças significativas entre as médias de acordo com o teste HSD de Tukey ($p < 0.05$).

4.3. Propriedades Bioativas

4.3.1. Atividade Antioxidante

Existem vários métodos descritos na literatura para avaliar a capacidade antioxidante, mas nenhum deles é preciso e universal o suficiente para ser aplicado consistentemente em todos os casos. Adicionalmente, alguns métodos disponíveis dependem de compostos que não ocorrem naturalmente no ambiente celular. Por isso, para avaliar a capacidade de prevenção e atraso da oxidação molecular, devem ser utilizados métodos diferentes. Neste trabalho, são utilizadas a avaliação da inibição da peroxidação lipídica (TBARS) e a hemólise oxidativa (OxHLIA), onde o ensaio de TBARS foi realizado em tecidos cerebrais de porco e o de OxHLIA em sangue de ovelha.

Os resultados obtidos encontram-se apresentados na **Tabela 11**. Todos os extratos revelaram capacidade antioxidante nas concentrações testadas, exceto o extrato de pepininhos no estado maduro obtido por EAU durante 15 min, no ensaio de OxHLIA.

Os resultados obtidos revelam que os extratos possuem um potencial antioxidante interessante, apesar de muito superiores ao controle positivo. De referir que, com base nos valores de EC_{50} , quanto menor o valor, maior é o potencial antioxidante do extrato. O extrato de maceração do pepininho no estado maduro foi o que apresentou melhor atividade antioxidante para o método de TBARS, podendo ser explicado devido ao elevado teor de carotenoides presente em sua composição.

O EAU apresentou melhores valores para o pepininho no estado verde sendo o tempo de 10 min o que apresentou melhor atividade antioxidante em relação aos outros tempos de extração, podendo ser atribuído aos valores maiores de compostos fenólicos encontrados neste extrato. Para o pepininho maduro, a EAU que apresentou melhor potencial foi o com o tempo de extração igual a 5 min. Já para o método OxHLIA, os melhores resultados, foram de uma forma geral, para os extratos obtidos por EAU durante 5 min (EAU 5) para ambos os estados de maturação, sendo que no caso dos pepininhos verdes os valores de EC_{50} obtidos foram muito similares aos obtidos para os extratos preparados por maceração.

É interessante referir que ao comparar os resultados obtidos nos dois ensaios com os estados de maturação das amostras, para os diferentes tempos de extração para EAU,

verifica-se que de uma maneira geral os melhores resultados de atividade antioxidante correspondem ao menor tempo de extração, o que sugere uma possível degradação de compostos bioativos nas extrações mais longas.

Tabela 11. Atividade antioxidante dos frutos de *Coccinia grandis*.

	Extração	Estado Imaturo	Estado Maduro	Controlo Positivo	<i>t</i> -student test <i>p</i> -value
Atividade Antioxidante				Trolox	
TBARS (EC ₅₀ , mg/mL)	Maceração	9,6±0,3	1,31±0,02		<0,001
	EAU 5*	4,6±0,2	2,01±0,04	0,0054 ± 0,0003	<0,001
	EAU 10*	4,5±0,3	4,4±0,1		0,249
	EAU 15*	5,9±0,1	4,8±0,3		<0,001
Maceração	0,153±0,004	0,225±0,01	<0,001		
OxHLIA (IC ₅₀ ; mg/mL) Δ <i>t</i> = 60 min	EAU 5	0,157±0,003	0,153±0,004	0,00217 ± 0,0007	0,885
	EAU 10	0,348±0,01	0,245±0,008		<0,001
	EAU 15	0,355±0,012	0,281±0,012		<0,001
	Maceração	0,208±0,006	0,343±0,014		<0,001
OxHLIA (IC ₅₀ ; mg/mL) Δ <i>t</i> = 120 min	EAU 5	0,206±0,005	0,237±0,007	0,0435 ± 0,0008	<0,001
	EAU 10	0,473±0,016	0,367±0,013		<0,001
	EAU 15	0,441±0,019	na		-
	Maceração	0,208±0,006	0,343±0,014		<0,001

Resultados expressos em média±DP, *n*=3. EC₅₀: concentração de extrato correspondente a 50% de atividade antioxidante. As diferenças significativas (*p* < 0,05) foram avaliadas pelo teste Student's *t*-test. * EAU – Extração Assistida por Ultrassom com os respectivos tempos 5, 10 e 15 min. na- nenhuma atividade.

A propriedade biológica mais descrita e estudada da planta *C. grandis* é sua atividade antioxidante. A maioria dos estudos sobre a planta utilizou o ensaio de avaliação da atividade captadora de radicais DPPH. Meenatchi *et al.* (2017) avaliaram a atividade antioxidante de frutos verdes de *C. grandis* e os resultados obtidos demonstraram elevada atividade antioxidante nos extratos metanólicos da planta. Kubola *et al.* (2011) realizaram um estudo onde avaliaram a atividade DPPH de extratos metanólicos de frutos de várias espécies, incluindo os frutos imaturos de *C. grandis* os quais apresentaram uma maior percentagem de inibição de radicais livres do que os frutos maduros (43,43 % e 6,55%,

respectivamente). De forma similar, num estudo mais recente, Lee e Joo (2022) também realizaram o ensaio DPPH em extratos etanólicos em diferentes estados de maturação destes frutos, onde o estado imaturo apresentou maior potencial antioxidante em relação ao estado maduro.

4.3.2. Atividade Citotóxica e Anti-Inflamatória

A avaliação da citotoxicidade foi realizada *in vitro*, em três linhas celulares tumorais e uma linha celular não tumoral, através do ensaio SRB. Os resultados foram expressos em valores de concentração de extrato responsável por inibir em 50% o crescimento celular (GI_{50} $\mu\text{g/mL}$) e estão representados na **Tabela 12**.

A atividade anti-inflamatória foi realizada através da capacidade de inibição da produção de óxido nítrico (NO) em linha celular de macrófagos de rato RAW 264.7 após o estímulo à resposta inflamatória por lipopolissacarídeos, sendo os resultados expressos em IC_{50} $\mu\text{g/mL}$ que corresponde a concentração responsável por 50% da atividade anti-inflamatória e também se encontram na **Tabela 12**.

Valores baixos de GI_{50} são preferíveis para células de linhas tumorais, apresentando maior atividade inibitória de proliferação dessas células prejudiciais à saúde. Porém, para as células não tumorais é preferível que os valores de GI_{50} sejam maiores, pois assim há maior segurança e demonstram que tais extratos não são prejudiciais a quem consome.

Os extratos hidroetanólicos dos frutos de *C. grandis* não apresentaram atividade citotóxica para as células tumorais, o que significa que não inibiram o crescimento das mesmas. Porém, também não apresentaram citotoxicidade, sendo assim não causam danos a saúde do consumidor. Até ao momento, não existem estudos que forneçam detalhes sobre a atividade citotóxica ou citotoxicidade dos frutos de *C. grandis* para realizar a comparação dos resultados obtidos.

Apesar de Manju e Sunny (2019) terem observado que os extratos aquosos de folhas de *C. grandis* apresentam potencial anti-inflamatório, e de Nagare *et al.* (2015) referir que extratos metanólicos de frutos de uma espécie do mesmo género (*Coccinia indica* Wight & Arn) apresentam potencial anti-inflamatório, tal não foi demonstrado neste trabalho para os pepininhos silvestres, os quais não apresentaram atividade anti-inflamatória nas concentrações testadas.

Tabela 12. Atividade citotóxica em linhas celulares tumorais e não tumorais dos frutos de *Coccinia grandis*

	Extração	Estado imaturo	Estado maduro	Controlo positivo
Citotoxicidade em linhas celulares tumorais (GI₅₀ µg/mL)				Ellipticina
AGS (Adenocarcinoma gástrico)	Maceração	>400	>400	1,23 ± 0,03
	EAU 5	>400	>400	
	EAU 10	>400	>400	
	EAU 15	>400	>400	
CaCo ₂ (Adenocarcinoma coloretal)	Maceração	>400	>400	1,21 ± 0,02
	EAU 5	>400	>400	
	EAU 10	>400	>400	
	EAU 15	>400	>400	
MCF-7 (carcinoma de mama)	Maceração	>400	>400	1,02 ± 0,02
	EAU 5	>400	>400	
	EAU 10	>400	>400	
	EAU 15	>400	>400	
Citotoxicidade para linhas celulares não tumorais (GI₅₀ µg/mL)				
VERO	Maceração	>400	>400	1,41 ± 0,06
	EAU 5	>400	>400	
	EAU 10	>400	>400	
	EAU 15	>400	>400	
Atividade anti-inflamatória (IC₅₀ µg/mL)				Dexametasona
RAW 264.7	Maceração	>400	>400	6,3 ± 0,4
	EAU 5	>400	>400	
	EAU 10	>400	>400	
	EAU 15	>400	>400	

Resultados expressos em média±DP, $n=3$. GI₅₀- concentração de extrato responsável por inibir 50% inibição do crescimento do tumor humano (AGS, CaCo₂, e MCF-7) ou linhas celulares não tumorais (Vero). As diferenças significativas ($p < 0,05$) foram avaliadas pelo teste Student's *t*-test. * EAU – Extração Assistida por Ultrassom com os respectivos tempos 5, 10 e 15 min.

4.3.3. Atividade Antibacteriana e Antifúngica

Com o passar do tempo, as estirpes bacterianas evoluíram e se tornaram cada vez mais resistentes aos medicamentos. Como resultado, houve um aumento na procura por estratégias que utilizem fontes naturais como agentes antimicrobianos e antifúngicos para minimizar os efeitos da resistência (Konaklieva & Plotkin, 2023). A segurança alimentar exige um controlo rigoroso dos microrganismos e das suas toxinas, uma vez que a ingestão de alimentos contaminados pode resultar em efeitos nocivos à saúde do consumidor, inclusive podendo levar à morte. Considerando o potencial inerente dos recursos naturais e o facto de que ainda existe um grande número e variedade de espécies vegetais pouco exploradas no planeta, é de referir que estes recursos estão sendo cada vez mais objeto de investigação. Podem representar uma fonte de novas soluções para minimizar os problemas relacionados com a saúde pública atualmente.

Neste trabalho, foi conduzido um estudo para avaliar o potencial antimicrobiano e antifúngico dos frutos dos pepininhos silvestres, através do métodos de microdiluição, utilizando extratos hidroetanólicos obtidos por maceração e EAU (com diferentes tempos de sonicação 5, 10 e 15 min), como referido anteriormente. Os resultados obtidos para a extração por maceração apresentam-se na **Tabela 13** e por EAU na **Tabela 14**. A concentração máxima testada foi de 10 mg/mL.

De uma forma geral, os extratos obtidos por maceração apresentaram melhores resultados que os obtidos por EAU. Para ambos os estados de maturação, os primeiros apresentaram atividade inibitória contra todas as bactérias Gram-negativo testadas, ao passo que os segundos não evidenciaram atividade contra *E. cloacae*, *P. aeruginosa* e *B. cereus*. Os melhores resultados foram obtidos para os extratos por maceração dos pepininhos maduros na inibição das estirpes *Y. enterocolitica* (MIC = 1,25 mg/mL) e *S. enterica* (MIC = 2,5 mg/mL). Contudo, o extrato obtido por EAU demonstrou uma MIC inferior face a *S. enterica* (1,25 mg/mL). Ao analisar os resultados da extração por EAU, observou-se que não houve diferença entre os tempos de extração. Os melhores resultados foram obtidos na inibição de *S. enterica* e *S. aureus* com CMI de 1,25 mg/mL.

Comparando os dois estados de maturação nos extratos realizados por maceração, o estado maduro apresentou melhores resultados do que o estado imaturo, ao passo que, não foram verificadas diferenças para os estados de maturação no que respeita a EAU. Nenhum dos extratos apresentou atividade bactericida face aos microrganismos nas concentrações testadas.

Em relação aos fungos analisados, o extrato hidroetanólico obtido por maceração apresentou atividade inibitória nas concentrações testadas tanto para o *A. brasiliensis* quanto para o *A. fumigatus*. Porém, novamente o estado maduro apresentou MICs inferiores em comparação com o estado imaturo. Nenhum estado de maturação apresentou atividade fungicida nas concentrações testadas. Já para o extrato por EAU, os resultados não foram tão positivos uma vez que não se verificou atividade inibitória face a *A. fumigatus*, e para *A. brasiliensis* a inibição ocorreu somente na concentração mais elevada (10 mg/mL). Em geral, a extração por maceração apresentou resultados de atividade antimicrobiana superiores aos extratos realizados por EAU.

Sakharkar e Chauhan (2017) avaliaram a atividade antibacteriana de extratos de frutos imaturos de *C. grandis*, onde os extratos obtidos por extração a frio (4 °C) foram mais eficazes contra as bactérias do que os extratos obtidos por extração a quente (58 °C). Além disso, compararam os resultados obtidos com os resultados apresentados em outros estudos e verificaram que os extratos dos frutos possuem maior atividade antibacteriana do que as folhas de *C. grandis*. Shaheen *et al.* (2009) determinaram a atividade antibacteriana de oito extratos diferentes de frutos de *C. indica*, sendo o mais eficaz contra bactérias Gram-positivo e Gram-negativo o obtido com éter de petróleo. O extrato etanólico não foi eficaz contra a *Salmonella paratyphi*.

Tabela 13. Atividade antimicrobiana e antifúngica (CMI, CMB e CMF mg/mL) de extratos hidroetanólicos por maceração dos frutos de *Coccinia grandis*

	Estado Imaturo		Estado Maduro		Ampicillina (10 mg/mL)		Imipenem (1 mg/mL)		Vancomicina (1 mg/mL)	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
Bactérias Gram-negativo										
<i>Enterobacter cloacae</i>	10	>10	10	>10	<0,15	<0,15	<0,0078	<0,0078	n.t.	n.t.
<i>Escherichia coli</i>	10	>10	5	>10	10	>10	<0,0078	<0,0078	n.t.	n.t.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10	>10	10	>10	>10	>10	<0,0078	<0,0078	n.t.	n.t.
<i>Salmonella enterica</i>	5	>10	2,5	>10	<0,15	<0,15	<0,0078	<0,0078	n.t.	n.t.
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1,25	>10	1,25	>10	>10	>10	0,5	1	n.t.	n.t.
Bactérias Gram-positivo										
<i>Bacillus cereus</i>	>10	>10	10	>10	<0,15	<0,15	n.t.	n.t.	<0,0078	<0,0078
<i>Listeria monocytogenes</i>	5	>10	5	>10	<0,15	<0,15	<0,0078	<0,0078	n.t.	n.t.
<i>Staphylococcus aureus</i>	2,5	>10	2,5	>10	<0,15	<0,15	n.t.	n.t.	0,25	0,5

Fungos	Cetoconazol					
	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	10	>10	5	>10	0,06	0,125
<i>Aspergillus fumigatus</i>	10	>10	10	>10	0,5	1

nt- não testado.

Tabela 14. Atividade antimicrobiana e antifúngica (CMI, CMB e CMF mg/mL) dos extratos hidroetanólicos assistidos por ultrassom (EAU) de *Coccinia grandis*

	Estado Imaturo						Estado Maduro						Streptomicina 1 mg/mL		Methicilin 1 mg/mL		Ampicillina 10 mg/mL		
	EAU 5		EAU 10		EAU 15		EAU 5		EAU 10		EAU 15								
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	
Bacteria Gram-negativa																			
<i>Enterobacter cloacae</i>	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	0,007	0,007	n.t.	n.t.	0,15	0,15
<i>Escherichia coli</i>	5	>10	5	>10	5	>10	5	>10	5	>10	5	>10	0,01	0,01	n.t.	n.t.	0,15	0,15	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	0,06	0,06	n.t.	n.t.	0,63	0,63	
<i>Salmonella enterica</i>	1,25	>10	1,25	>10	1,25	>10	1,25	>10	1,25	>10	1,25	>10	0,007	0,007	n.t.	n.t.	0,15	0,15	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	10	>10	10	>10	10	>10	10	>10	10	>10	10	>10	0,007	0,007	n.t.	n.t.	0,15	0,15	
Bacteria Gram-positiva																			
<i>Bacillus cereus</i>	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	0,007	0,007	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<i>Listeria monocytogenes</i>	5	>10	5	>10	5	>10	5	>10	5	>10	5	>10	0,007	0,007	n.t.	n.t.	0,15	0,15	
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,25	>10	1,25	>10	1,25	>10	1,25	>10	1,25	>10	1,25	>10	0,007	0,007	0,007	0,007	0,15	0,15	

Fungo	Cetoconazol													
	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	10	>10	10	>10	10	>10	10	>10	10	>10	10	>10	0,06	0,125
<i>Aspergillus fumigatus</i>	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	0,5	1

EAU- Extração assistida por ultrassom com seus respectivos tempos de sonicação 5, 10 e 15 min. nt- não testada.

5. Considerações Finais

Entender a composição dos alimentos é fundamental para garantir que eles sejam seguros e de qualidade. A caracterização de alimentos permite identificar os nutrientes e substâncias químicas neles presentes, bem como as suas propriedades biológicas. Com essas informações, é possível determinar os benefícios para a saúde de cada alimento e garantir a sua autenticidade. Com base na importância da caracterização de alimentos, o objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização nutricional, química e bioativa dos frutos da espécie *C. grandis*.

Para o fornecimento de dados seguros e assegurar que a espécie estudada era realmente *C. grandis*, a análise de DNA comprovou a espécie estudada, com resultados entre 99 e 100% de exatidão. Na análise nutricional e química, os hidratos de carbono foram os compostos majoritários e a proteína o minoritário, sendo os valores similares para ambos os estados de maturação. Foram ainda analisados os teores em açúcares livres, sendo a frutose mais abundante, o estado maduro foi o que apresentou maiores teores de açúcares totais, isso pode ser explicado devido às mudanças bioquímicas que ocorrem durante o processo de amadurecimento.

Em relação aos ácidos orgânicos, foram quantificados e identificados seis no total, o estado imaturo apresentou maior quantidade de ácidos orgânicos, sendo o ácido succínico o majoritário nos dois estados de maturação analisados. No que respeita os ácidos gordos, os pepininhos verdes apresentaram melhores resultados em comparação com os vermelhos, já que nestes últimos, a predominância foi de ácidos gordos PUFA, em particular o ácido linoleico e ácido α -linolénico (ômega-3). Ao contrário dos pepininhos verdes, os pepininhos vermelhos apresentam maiores teores de ácidos gordos SFA, ácidos gordos que podem ser prejudiciais à saúde se consumidos em excesso. A parte edível apresentou boas concentrações de α -tocoferol, sendo mais uma vez o estado imaturo o que apresentou maiores teores de vitamina E.

Os resultados demonstram que os frutos maduros de *C. grandis* possuem maior quantidade de carotenoides totais expressos em β -caroteno do que os verdes. Durante o processo de amadurecimento as enzimas se tornam mais ativas e convertem os precursores de carotenoides a serem mais ativos. Em relação a análise de carotenoides, para trabalhos futuros, serão realizados a quantificação e identificação dos mesmos, para assim haver informações mais relevantes sobre os compostos de carotenoides.

Em relação às propriedades antimicrobianas, após analisar os diversos extratos, podemos concluir que o extrato hidroetanólico obtido por maceração apresentou resultados mais satisfatórios em comparação ao EAU. A eficácia da extração pode ser influenciada por vários fatores, como intensidade e duração do processo, tipo de solvente, temperatura, entre outros. Além disso, a extração hidroetanólica por maceração é um método tradicional e amplamente utilizado, sendo considerado o mais eficaz. Portanto, em estudos futuros, seria interessante testar diferentes parâmetros de extração para os extratos assistidos por ultrassom, a fim de obter resultados ainda melhores.

Relativamente à atividade antioxidante, os extratos obtidos por EAU apresentaram melhores resultados, uma vez que seus valores foram menores em comparação aos extratos obtidos por maceração. Isso pode ser explicado pelas diferentes composições nos extratos obtidos, que variam de acordo com o método de extração utilizado.

Os resultados obtidos para a atividade citotóxica, demonstram que frutos de *C. grandis* não apresentaram atividade citotóxica para células tumorais e nem para células não tumorais testadas. Não se verificou também atividade anti-inflamatória.

Neste estudo foram identificados os compostos fenólicos nos extratos hidroetanólicos dos pepininhos, sendo identificados 14 polifenóis, principalmente ácidos fenólicos e seus derivados glicosilados. Além disso, foram encontrados 9 flavonoides glicosídeos, destacando-se a rutina e o kaempferol-3-*O*-rutinosídeo. Os perfis de compostos fenólicos nos extratos de pepininhos verdes e maduros foram semelhantes, com diferenças significativas observadas nos estados de maturação, onde os derivados dos ácidos cafeoilquínico e coumaroilquínico foram predominantes nos pepininhos verdes, enquanto os flavonoides se destacaram nos pepininhos maduros. A rutina foi o composto mais abundante em ambos os estados de maturação dos pepininhos. Os resultados indicam que a extração assistida por ultrassom foi mais eficiente na recuperação dos polifenóis em comparação com o método de maceração. Assim, evidência o potencial promissor da extração assistida por ultrassom como um método rápido para obter biomoléculas de fontes naturais, oferecendo uma alternativa promissora para a extração de compostos fenólicos dos pepininhos.

Os extratos de pepininhos silvestres podem ser considerados bom agentes antioxidantes, já que para as análises realizadas, todos os extratos apresentaram atividade

antioxidante, exceto para o extrato EUA 15 min no método OxHLIA $\Delta t=60\text{min}$. De maneira geral, os pepininhos vermelhos apresentaram melhor atividade antioxidante, já que os valores obtidos foram menores em relação ao EC_{50} (capacidade de inibir 50% da atividade antioxidante). Os pepininhos silvestres são bons agentes antioxidantes devido à sua composição, apresentando elevadas concentrações de tocoferóis e carotenoides.

Em geral, os extratos hidroetanólicos obtidos por maceração de frutos maduros foram mais eficazes na atividade antimicrobiana e antifúngica contra os microrganismos testados, mas nenhum dos extratos demonstrou atividade bactericida contra esses microrganismos. Embora tenham sido obtidos resultados promissores, é necessário realizar mais estudos para explorar e destacar a relevância da *C. grandis*. Por exemplo, podem ser conduzidas análises sensoriais e avaliações da aceitabilidade dos frutos em diversas preparações, a fim de garantir a sua incorporação na dieta e valorizar a diversidade de espécies vegetais. Para obter um melhor entendimento sobre a composição dos pepininhos em relação aos carotenoides, é necessária a quantificação individual desses compostos.

Em suma, a produção de extratos diversos é essencial nas indústrias alimentícia, química e farmacêutica. Esses extratos oferecem compostos bioativos para alimentos funcionais, ingredientes naturais, produtos químicos sustentáveis e medicamentos. Contribuem para a criação de produtos mais saudáveis e de qualidade, impulsionando a inovação nessas indústrias.

Em conclusão, os objetivos propostos para este trabalho de dissertação foram todos alcançados, fornecendo informações relevantes sobre a composição nutricional, química e bioativa da *Coccinia grandis*, além de valorizar a espécie como um mini-legume. Os resultados obtidos são bastante promissores e abrem perspectivas para futuras pesquisas nessa área, a fim de explorar ainda mais as propriedades terapêuticas e nutricionais desta planta.

Referências

- Abel, S. D. A., & Baird, S. K. (2018). Honey is cytotoxic towards prostate cancer cells but interacts with the MTT reagent: Considerations for the choice of cell viability assay. *Food Chemistry*, 241, 70–78. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.083>
- Ajuru, M., & Nmon, F. (2017). A Review on the Economic Uses of Species of Cucurbitaceae and Their Sustainability in Nigeria. *American Journal of Plant Biology*, 2(1), 17–24. <https://doi.org/doi:10.11648/j.ajpb.20170201.14>
- Ambrósio, C. L. B., Campos, F. de A. C. e S., & Faro, Z. P. de. (2006). Carotenoides como alternativa contra a hipovitaminose A. *Revista de Nutrição*, 19(2), 233–243. <https://doi.org/10.1590/s1415-52732006000200010>
- Angelo, P. M., & Jorge, N. (2007). Phenolic compounds in foods – A brief review. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, 66(1), 1–9. <https://doi.org/https://doi.org/10.53393/rial.2007.v66.32841>
- AOAC International. (2016). *Official Methods of Analysis of Aoac International* (Dr. G. W. Latimer, Jr, Ed.; 20th ed.). AOAC International.
- Arroyo, B. J., Santos, A. P., de Almeida de Melo, E., Campos, A., Lins, L., & Boyano-Orozco, L. C. (2019). Bioactive compounds and their potential use as ingredients for food and its application in food packaging. In *Bioactive Compounds* (pp. 143–156). Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-814774-0.00008-6>
- Arruda, H. S., Neri-Numa, I. A., Kido, L. A., Maróstica Júnior, M. R., & Pastore, G. M. (2020). Recent advances and possibilities for the use of plant phenolic compounds to manage ageing-related diseases. *Journal of Functional Foods*, 75, 104203. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104203>
- Astiti, M. A., Jittmittraphap, A., Leungwutiwong, P., Chutiwitoonchai, N., Pripdeevech, P., Mahidol, C., Ruchirawat, S., & Kittakoop, P. (2021). LC-QTOF-MS/MS Based

- Molecular Networking Approach for the Isolation of α -Glucosidase Inhibitors and Virucidal Agents from *Coccinia grandis* (L.) Voigt. *Foods*, 10(12), 3041. <https://doi.org/10.3390/foods10123041>
- Avinash, T. S., & Rai, V. R. (2017). An ethanobotanical investigation of cucurbitaceae from South India: A review. *Journal of Medicinal Plants Studies*, 5(3), 250–254.
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426–436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
- Azwanida, N. N. (2015). A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Medicinal & Aromatic Plants*, 04(03). <https://doi.org/10.4172/2167-0412.1000196>
- Barros, L., Pereira, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2012). Optimized Analysis of Organic Acids in Edible Mushrooms from Portugal by Ultra Fast Liquid Chromatography and Photodiode Array Detection. *Food Analytical Methods*, 6(1), 309–316. <https://doi.org/10.1007/s12161-012-9443-1>
- Barroso, M. do R., Magalhães, M. J., Carnide, V., & Martins, S. (2007). Curcubitáceas de Trás-os-Montes. *Direcção Regional de Agricultura e Pescas do Norte (DRAPN) Núcleo de Documentação e Relações Públicas (NDRP)*.
- Batista-Silva, W., Nascimento, V. L., Medeiros, D. B., Nunes-Nesi, A., Ribeiro, D. M., Zsögön, A., & Araújo, W. L. (2018). Modifications in organic acid profiles during fruit development and ripening: Correlation or causation? *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01689>
- Beera, A. M., Nori, L. P., & Seethamraju, S. M. (2022). Nutritional and therapeutic potential of coccinia grandis (l) vogit: A wonder vegetable. *Pharma Times*, 54(7).

- Bessada, S. M. F., Barreira, J. C. M., Barros, L., Ferreira, I. C. F. R., & Oliveira, M. B. P. P. (2016). Phenolic profile and antioxidant activity of *Coleostephus myconis* (L.) Rchb.f.: An underexploited and highly disseminated species. *Industrial Crops and Products*, 89, 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.04.065>
- Bouarab Chibane, L., Degraeve, P., Ferhout, H., Bouajila, J., & Oulahal, N. (2018). Plant antimicrobial polyphenols as potential natural food preservatives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(4), 1457–1474. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9357>
- Bulbul, I., & Nahar, L. (2011). Antibacterial, cytotoxic and antioxidant activity of chloroform, n-hexane and ethyl acetate extract of plant *Coccinia cordifolia*. *Agriculture and Biology Journal of North America*, 2(4), 713–719. <https://doi.org/10.5251/abjna.2011.2.4.713.719>
- Carocho, M., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.021>
- CBOL, Plant Working Group (2009). A DNA barcode for land plants. Communicated by Janzen, D. H. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(31), 12794–12797. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905845106>
- Combs, Jr., G. F., & McClung, J. P. (2022). Sources of the vitamins. In *The Vitamins* (pp. 593–623). Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-323-90473-5.00027-6>
- Conceição, K. N., Sampaio, F. A. S. A., da Silva, V. F., & da Silva, A. O. (2017). Poder antioxidante de carotenoides, flavonoides e vitamina e na prevenção da arteriosclerose. *Revista Ciência & Saberes-Facema*, 2(4), 320–324.

- Cragg, G. M., & Newman, D. J. (2013). Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1830(6), 3670–3695. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.02.008>
- Croteau, R.; Kutchan, T. M.; Lewis, N. G. (2000). Natural products (secondary metabolites). In: Buchanan, B.; Grisse, W.; Jones, R. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Rockville, MD. p. 1250-1318.
- Dala Paula, B. M. (2021). *Química & Bioquímica de Alimentos* (1st ed.). Editora Universidade Federal de Alfnas.
- DeSalle, R., & Goldstein, P. (2019). Review and interpretation of trends in DNA barcoding. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 7. <https://doi.org/10.3389/fevo.2019.00302>
- Deshpande, S. V., Patil, M. J., Daswadkar, S. C., Suralkar, U., & Agarwal, A. (2011a). A study on anti-inflammatory activity of the leaf and stem extract of coccinia grandis voigt. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 2, 247–250.
- Deshpande, S. V., Patil, M. J., Parmar, K. K., Daswadkar, S. C., & Khodade, R. B. (2011b). A study on antioxidant activity of fruit extracts of coccinia grandis l.voigt. *International Journal of Drug Research and Technology*, 1(1).
- Djuricic, I., & Calder, P. C. (2021). Beneficial outcomes of omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on human health: An update for 2021. *Nutrients*, 13(7), 2421. <https://doi.org/10.3390/nu13072421>
- Dornas, W. C., Oliveira, T. T., Rodrigues das Dores, R. G., Santos, A. F., & Nagem, T. J. (2008). Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences*, 28(3), 241–249.
- Duarte, G. (2017). *Levantamento e Caracterização das plantas alimentícias não convencionais do Parque Florestal de Monsanto-Lisboa* [Tese de Mestrado] Ecologia Humana e Problemas Sociais Contemporâneos. Faculdade de Ciências Sociais e Humanas. Portugal

- Fernandes, S. S., Coelho, M. S., & Salas-Mellado, M. de las M. (2019). Bioactive compounds as ingredients of functional foods. In *Bioactive Compounds* (pp. 129–142). Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-814774-0.00007-4>
- Ferreira, I., Barros, L., & Abreu, R. (2009). Antioxidants in wild mushrooms. *Current Medicinal Chemistry*, *16*(12), 1543–1560. <https://doi.org/10.2174/092986709787909587>
- Ferreira, I. C. F. R., & Abreu, R. M. V. (2007). Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos. *Bioanálise*, *1*, 32–39.
- FiB (2018). Dossiê Extratos. *Revista Food Ingredients Brasil*. N° 45, 2018. <https://revista-fi.com.br>.
- Gadisa, E., Weldearegay, G., Desta, K., Tsegaye, G., Hailu, S., Jote, K., & Takele, A. (2019). Combined antibacterial effect of essential oils from three most commonly used Ethiopian traditional medicinal plants on multidrug resistant bacteria. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *19*(1). <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2429-4>
- Gaytán, V. G., Mendoza, M. de las N. R., Hernández, M. S., Trejo-Téllez, L. I., Santos, M. E. P., & Ponce, G. V. (2013). Volatile Components in the Flower, Pedicellate Ovary and Aqueous Residue of *Cymbidium* sp. (ORCHIDACEAE). *Journal of Analytical Sciences, Methods and Instrumentation*, *03*(04), 212–218. <https://doi.org/10.4236/jasmi.2013.34027>
- Gharaati Jahromi, S. (2019). Extraction techniques of phenolic compounds from plants. In *Plant Physiological Aspects of Phenolic Compounds*. IntechOpen. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.84705>
- Gharaati, S., Kargar, H., & Falahati, A. M. (2017). Tetrahydropyranylation of alcohols and phenols catalyzed by a new multi-wall carbon nanotubes-bound tin(IV) porphyrin. *Journal of the Iranian Chemical Society*, *14*(6), 1169–1178. <https://doi.org/10.1007/s13738-017-1067-3>

- Gokoglu, N. (2018). Novel natural food preservatives and applications in seafood preservation: A review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(5), 2068–2077.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.9416>
- Harine Sargunam, J. (2017). Ivy Gourd- Medicinal and Nutritional Values. *International Journal of Current Research*, 9(3), 47604–47607.
- Heleno, S. A., Ferreira, I. C. F. R., Esteves, A. P., Ćirić, A., Glamočlija, J., Martins, A., Soković, M., & Queiroz, M. J. R. P. (2013). Antimicrobial and demelanizing activity of *Ganoderma lucidum* extract, p-hydroxybenzoic and cinnamic acids and their synthetic acetylated glucuronide methyl esters. *Food and Chemical Toxicology*, 58, 95–100.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.04.025>
- Holstein, N. (2015). Monograph of coccinia (cucurbitaceae). *PhytoKeys*, 54, 1–166.
<https://doi.org/10.3897/phytokeys.54.3285>
- Hossain, M. B., Brunton, N. P., Patras, A., Tiwari, B., O'Donnell, C. P., Martin-Diana, A. B., & Barry-Ryan, C. (2012). Optimization of ultrasound assisted extraction of antioxidant compounds from marjoram (*Origanum majorana* L.) using response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19(3), 582–590.
<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2011.11.001>
- Huber, L. S., & Rodriguez Amaya, D. B. (2008). Flavonóis e flavonas: Fontes brasileiras e fatores que influenciam a composição em alimentos. *Alim. Nutr.*, 19(1), 97–108.
- Institute of Medicine. (2000). *Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids*. National Academies Press. <http://dx.doi.org/10.17226/9810>
- Kinupp, V. F., & de Barros, I. B. I. (2004). Levantamento de dados e divulgação do potencial das plantas alternativas no Brasil. *Horticultura Brasileira*, 22(2).
- Kinupp, V. F., & Lorenzi, H. (2014). *Plantas alimentícias não convencionais (PANC) no Brasil: Guia de identificação, aspectos nutricionais e receitas ilustradas*.

- Kobus, Z., Pecyna, A., Buczaj, A., Krzywicka, M., Przywara, A., Nadulski, R. (2022). Optimization of the Ultrasound-Assisted Extraction of Bioactive Compounds from *Cannabis sativa* L. Leaves and Inflorescences Using Response Surface Methodology. *Applied Sciences*, 12(13), 6747. <https://doi.org/10.3390/app12136747>
- Konaklieva, M. I., & Plotkin, B. J. (2023). Fragment-Based lead discovery strategies in antimicrobial drug discovery. *Antibiotics*, 12(2), 315. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12020315>
- Kondhare, D., & Lade, H. (2017). Phytochemical profile, aldose reductase inhibitory, and antioxidant activities of Indian traditional medicinal *Coccinia grandis* (L.) fruit extract. *Biotech*, 7(6). <https://doi.org/10.1007/s13205-017-1013-1>
- Kubola, J., Siriamornpun, S., & Meeso, N. (2011). Phytochemicals, vitamin C and sugar content of Thai wild fruits. *Food Chemistry*, 126(3), 972–981. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.104>
- Kumar, P., Singh, V. P., Agrawal, R. K., & Singh, S. (2008). Identification of *Pasteurella multocida* isolates of ruminant origin using polymerase chain reaction and their antibiogram study. *Tropical Animal Health and Production*, 41(4), 573–578. <https://doi.org/10.1007/s11250-008-9226-2>
- Leal, M. L. (2015). *Conhecimento e uso de plantas alimentícias não convencionais (PANC) no Ribeirão da Ilha–Florianópolis/SC*. [Curso de Ciências Biológicas]. Repositório Institucional UFSC.
- Lee, I. Y., & Joo, N. (2022). Identification and Quantification of Key Phytochemicals, Phytohormones, and Antioxidant Properties in *Coccinia grandis* during Fruit Ripening. *Antioxidants*, 11(11), 2218. <https://doi.org/10.3390/antiox11112218>

- Lima, F. E. L. de, Menezes, T. N. de, Tavares, M. P., Szarfarc, S. C., & Fisberg, R. M. (2000). Ácidos graxos e doenças cardiovasculares: Uma revisão. *Revista de Nutrição*, 13(2), 73–80. <https://doi.org/10.1590/s1415-52732000000200001>
- Lin, D., Xiao, M., Zhao, J., Li, Z., Xing, B., Li, X., Kong, M., Li, L., Zhang, Q., Liu, Y., Chen, H., Qin, W., Wu, H., & Chen, S. (2016). An overview of plant phenolic compounds and their importance in human nutrition and management of type 2 diabetes. *Molecules*, 21(10), 1374. <https://doi.org/10.3390/molecules21101374>
- Lockowandt, L., Pinela, J., Roriz, C. L., Pereira, C., Abreu, R. M. V., Calhelha, R. C., Alves, M. J., Barros, L., Bredol, M., & Ferreira, I. C. F. R. (2019). Chemical features and bioactivities of cornflower (*Centaurea cyanus* L.) capitula: The blue flowers and the unexplored non-edible part. *Industrial Crops and Products*, 128, 496–503. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.11.059>
- Ložienė, K., Venskutonis, P. R., Šipailienė, A., & Labokas, J. (2007). Radical scavenging and antibacterial properties of the extracts from different *Thymus pulegioides* L. chemotypes. *Food Chemistry*, 103(2), 546–559. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.08.027>
- Łuczaj, Ł., Pieroni, A., Tardío, J., Pardo-de-Santayana, M., Sõukand, R., Svanberg, I., & Kalle, R. (2012). Wild food plant use in 21st century Europe: The disappearance of old traditions and the search for new cuisines involving wild edibles. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 81(4), 359–370. <https://doi.org/10.5586/asbp.2012.031>
- Mafra, I., Ferreira, I. M. P. L. V. O., & Oliveira, M. B. P. P. (2008). Food authentication by PCRbased methods. *European Food Research and Technology*, 227(3), 649–665. <https://doi.org/10.1007/s00217-007-0782-x>
- Mala, P., Arpita, G., & Sunita, S. (2014). *Coccinia grandis* (L.) voigt. A chemo profile study. *Bionano Frontier*, 7(2).

- Manju, M. M., & Sunny, B. (2019). A Compendious Write-Up on *Coccinia grandis*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 54(2), 29–36.
- MAPA, M. da A., Pecuária e Abastecimento. (2010). *Manual de Hortaliças* (1st ed.).
- Martins-da-Silva, R.C.V. (2002). Coleta e Identificação de Espécimes Botânicos. *Embrapa Amazônia Oriental*, Doc. 143. Belém. 40p.
- Martins, N., Barros, L., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2016). Antioxidant potential of two Apiaceae plant extracts: A comparative study focused on the phenolic composition. *Industrial Crops and Products*, 79, 188–194. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.11.018>
- McCreight, J. D. (2017). *Genetics and genomics of cucurbitaceae*. Springer International Publishing. <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-49332-9>
- Meenatchi, P., Purushothaman, A., & Maneemegalai, S. (2017). Antioxidant, antiglycation and insulinotropic properties of *Coccinia grandis* (L.) in vitro: Possible role in prevention of diabetic complications. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 7(1), 54–64. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2016.01.002>
- Mercadante, A. Z., Rodrigues, D. B., Petry, F. C., & Mariutti, L. R. B. (2017). Carotenoid esters in foods - A review and practical directions on analysis and occurrence. *Food Research International*, 99, 830–850. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.12.018>
- Monalisa, M. N., Al-Nahain, A., & Rahmatullah, M. (2014). *Coccinia grandis*: a plant with multiple ethnomedicinal uses. *World J Pharm Pharm Sci*, 3(9), 1382–1392.
- Monsen, E. R. (2000). Dietary reference intakes for the antioxidant nutrients. *Journal of the American Dietetic Association*, 100(6), 637–640. [https://doi.org/10.1016/s0002-8223\(00\)00189-9](https://doi.org/10.1016/s0002-8223(00)00189-9)
- Msagati, T. A. M. (2012). *Chemistry of food additives and preservatives*. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/9781118274132>

- Mukherjee, P. K., Singha, S., Kar, A., Chanda, J., Banerjee, S., Dasgupta, B., Haldar, P. K., & Sharma, N. (2022). Therapeutic importance of Cucurbitaceae: A medicinally important family. *Journal of Ethnopharmacology*, 282, 114599. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114599>
- Nagare, S. N., Deokar, G. S., Rupali, N., & Nilesh, P. (2015). Review on coccinia grandis (l) voigt (ivy gourd). *World Journal of Pharmaceutical Research*, 4(10).
- Neetu, Purwar, S., Bisht, V., N., & Maurya, B. K. (2020). Nutritional and therapeutic values of Coccinea grandis: A review. *International Journal of Chemical Studies*, 8(4), 1555–1561. <https://doi.org/10.22271/chemi.2020.v8.i4o.9832>
- Obodai, M., Blanchette, R. A., Barnes, C. W., Otto, E. C., Narh Mensah, D. L., Dzomeku, M., Prempeh, J., & Takli, R. K. (2016). Identification of Species within the Ganoderma lucidum Complex in Ghana. *Food Research Institute*.
- Oyazabal, O. A., Kathariou, S. (2014). DNA methods in food safety: molecular typing of foodborne and waterborne bacterial pathogens. *John Wiley & Sons, Ltd*. 1. Ed. Chichester, UK. <http://doi.wiley.com/10.1002/9781118278666>
- Pacheco, S., Peixoto, F. M., Borguini, R. G., Nascimento, L. da S. de M. do, Bobeda, C. R. R., Santiago, M. C. P. de A., & Godoy, R. L. de O. (2014). Microscale extraction method for HPLC carotenoid analysis in vegetable matrices. *Scientia Agricola*, 71(5), 416–419. <https://doi.org/10.1590/0103-9016-2013-0402>
- Pari, L., & Saravanan, R. (2007). Beneficial effect of succinic acid monoethyl ester on erythrocyte membrane bound enzymes and antioxidant status in streptozotocin–nicotinamide induced type 2 diabetes. *Chemico-Biological Interactions*, 169(1), 15–24. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2007.04.010>

- Patrick, J. W., C. Botha, F., & G. Birch, R. (2012). Metabolic engineering of sugars and simple sugar derivatives in plants. *Plant Biotechnology Journal*, 11(2), 142–156. <https://doi.org/10.1111/pbi.12002>
- Pattanayak, S. P., & Sunita, P. (2009). In vivo antitussive activity of *Coccinia grandis* against irritant aerosol and sulfur dioxide-induced cough model in rodents. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 4(2). <https://doi.org/10.3329/bjp.v4i2.1537>
- Pekamwar, S. S., Kalyankar, T. M., & Kpkate, S. S. (2013). Pharmacological Activities of *Coccinia grandis*: Review. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2013.3522>
- Pinto de Lemos Júnior, H., & Alves de Lemos, A. L. (2010). Vitamina A. *Diagnostico Tratamento*, 15(3), 122–124. <http://files.bvs.br/upload/S/1413-9979/2010/v15n3/a1534.pdf>
- Pires, T. C. S. P., Dias, M. I., Barros, L., Alves, M. J., Oliveira, M. B. P. P., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2018). Antioxidant and antimicrobial properties of dried Portuguese apple variety (*Malus domestica* Borkh. cv Bravo de Esmolfe). *Food Chemistry*, 240, 701–706. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.010>
- Putra, I. M., Fakhruddin, N., Nurrochmad, A., & Wahyuono, S. (2022). Antidiabetic activity of *Coccinia grandis* (L.) Voigt: Bioactive constituents, mechanisms of action, and synergistic effects. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. <https://doi.org/10.7324/japs.2021.120103>
- Queiroz, D., Paiva, A. de A., Pedraza, D. F., Cunha, M. A. L. da, Esteves, G. H., de Luna, J. G., & Diniz, A. da S. (2013). Deficiencia de vitamina A e fatores associados em crianças de areas urbanas. *Revista de Saúde Pública*, 47(2), 248–256. <https://doi.org/10.1590/s0034-8910.2013047002906>

- Rached, W., Calhella, R. C., Fernandes, Â., Carvalho, A. M., Bennaceur, M., Marouf, A., Barros, L., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2016). Phytochemical characterization and bioactive properties of *Osyris quadripartita* Salzm. ex Decne. leaves from Algeria. *RSC Advances*, 6(76), 72768–72776. <https://doi.org/10.1039/c6ra11787b>
- Rajput, M., & Kumar, N. (2020). Medicinal plants: A potential source of novel bioactive compounds showing antimicrobial efficacy against pathogens infecting hair and scalp. *Gene Reports*, 21, 100879. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2020.100879>
- Reiter, R. J., Acuña-Castroviejo, D., Tan, D.-X., & Burkhardt, S. (2006). Free radical-mediated molecular damage. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 939(1), 200–215. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb03627.x>
- Rinaldo, P. (n.d.). Organic acids. In *Laboratory Guide to the Methods in Biochemical Genetics* (pp. 137–169). Springer Berlin Heidelberg. Retrieved May 24, 2023, from http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-76698-8_9
- Rios, T. S., Torres, T. S., Cerrilla, M. E. O., Hernández, M. S., Cruz, A. D., Bautista, J. H., Cuéllar, C. N., & Huerta, H. V. (2014). Changes in composition, antioxidant content, and antioxidant capacity of coffee pulp during the ensiling process. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 43(9), 492–498. <https://doi.org/10.1590/s1516-35982014000900006>
- Roberfroid, M. B., Coxam, V., & Delzenne, N. (2008). *Aliments fonctionnels* (2nd ed.).
- Rodriguez-Amaya, D. B., L., Kimura, M., Amaya-Farfan, J. (2008). *Fontes brasileiras de carotenoides: Tabela brasileira de composição de carotenoides em alimentos*. Brasília: Ministério do Meio Ambiente.
- Romano, A., & Gonçalves, S. (2015). *Plantas Silvestre Comestíveis do Algarve*. Universidade do Algarve.
- Sakharkar, P., & Chauhan, B. (2017). Antibacterial, antioxidant and cell proliferative properties of *Coccinia grandis* fruits. *Avicenna J Phytomed*, 7(4), 295–307.

- Sarmento, A., Barros, L., Fernandes, Â., Carvalho, A. M., & Ferreira, I. C. (2014). Valorization of traditional foods: Nutritional and bioactive properties of *Cicer arietinum* L. and *Lathyrus sativus* L. pulses. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(1), 179–185. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6702>
- Sartori, V. C., Theodoro, H., Minello, L. V., Pansera, M. R., Basso, A., & Scur, L. (2020). *Plantas Alimentícias Não convencionais*.
- Shergill-Bonner, R. (2013). Micronutrients. *Paediatrics and Child Health*, 23(8), 331–336. <https://doi.org/10.1016/j.paed.2013.05.005>
- Shah, D., Sajjad, N., Ali, R., Nazir, N., Hassan, S., & Shah, S. (2019). Sugar regulates plant growth and development under in vitro conditions. In *Plant Signaling Molecules* (pp. 257–268). Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-816451-8.00015-0>
- Shaheen, S. Z., Bolla, K., Vasu, K., & Singara Charya, M. A. (2009). Antimicrobial activity of the fruit extracts of *Coccinia indica*. *African Journal of Biotechnology*, 8(24), 7073–7076.
- Siddika, A., Ashraduzzaman, M., Khatun, S., Khan, M., & Pervin, F. (2015). Changes in contents of some chemical compositions and activities of Hydrolytic and Oxidative Enzymes of *Coccinia cordifolia* l. fruits. *Journal of Bio-Science*, 21, 35–41. <https://doi.org/10.3329/jbs.v21i0.22517>
- Sobral, F., Sampaio, A., Falcão, S., Queiroz, M. J. R. P., Calhelha, R. C., Vilas-Boas, M., & Ferreira, I. C. F. R. (2016). Chemical characterization, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic properties of bee venom collected in Northeast Portugal. *Food and Chemical Toxicology*, 94, 172–177. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.06.008>
- Soethe, C., Steffens, C. A., Amarante, C. V. T. do, Martin, M. S. D., & Bortolini, A. J. (2016). Qualidade, compostos fenólicos e atividade antioxidante de amoras-pretas “Tupy” e “Guarani” armazenadas a diferentes temperaturas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 51(8), 950–957. <https://doi.org/10.1590/s0100-204x2016000800007>

- Spréa, R. M., Fernandes, Â., Calhella, R. C., Pereira, C., Pires, T. C. S. P., Alves, M. J., Canan, C., Barros, L., Amaral, J. S., & Ferreira, I. C. F. R. (2020). Chemical and bioactive characterization of the aromatic plant *Levisticum officinale* W.D.J. Koch: A comprehensive study. *Food & Function*, *11*(2), 1292–1303. <https://doi.org/10.1039/c9fo02841b>
- Theron, M. M., & Lues, J. F. R. (2010). *Organic acids and food preservation*. CRC Press. <http://dx.doi.org/10.1201/9781420078435>
- Trindade, H. (2010). Molecular biology of aromatic plants and spices. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, *25*(5), 272–281. <https://doi.org/10.1002/ffj.1974>
- Uthpala, T. G. G., Marapana, U., Lakmini, P. C., & Wettimuny, D. (2020, September 16). *Nutritional bioactive compounds and health benefits of fresh and processed cucumber (cucumis sativus L.)*. <http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.2.17510.04161>
- Vadivu, R., Krithika, A., Biplab, C., Dedeepya, P., Shoeb, N., & Lakshmi, K. S. (2010). Evaluation of hepatoprotective activity of the fruits of *coccinia grandis* linn. *International Journal of Health Research*, *1*(3). <https://doi.org/10.4314/ijhr.v1i3.55366>
- Varma, S. R., & Bhaskar, A. (2020). Phytochemical investigation and in vitro antioxidant activity of *coccinia grandis* fruit extract. *European Journal of Molecular & Clinical Medicine*, *07*(10).
- World Health Organization, (2015, January 1). *Guideline: Sugars intake for adults and children*. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/149782>
- Yamagata, K. (2023). Fatty acids act on vascular endothelial cells and influence the development of cardiovascular disease. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, *165*, 106704. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2023.106704>

-
- Yu, J., Xue, J. H., Zhou, S. L. (2011). New universal matK primers for DNNA barcoding angiosperms. *Journal of Systematics and Evolution*. 49(3), 176-181. <https://doi.org/10.1111/j.1759-6831.2011.00134.x>
- Zeikus, J. G., Jain, M. K., & Elankovan, P. (1999). Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51(5), 545–552. <https://doi.org/10.1007/s002530051431>

Trabalhos Publicados

1. Apresentação Oral

Daniela C. Elsenbach, Rossana Cardoso, Tânia Pires, Ana Filipa Mandim, Ângela Fernandes, Cristiane Canan, Lillian Barros, Joana S. Amaral (2022). Chemical and bioactive composition of wild cucumbers (*Coccinia grandis* (L.) Voigt). *I Encontro Consórcio Montanha para o Conhecimento de Jovens Investigadores – STEAM, VII Encontro Jovens Investigadores*. Bragança.

2. Pôster

Daniela C. Elsenbach, Joana Amaral, Ângela Fernandes, Cristiane Canan, Lillian Barros (2022). Nutritional and chemical characterization of ivy gourd (*Coccinia grandis*). *XVI Encontro de Química de Alimentos*. Castelo Branco. 320p.