



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO
SEMI-ÁRIDO PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE BIOCÊNCIAS
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

JULIANNY ALMEIDA JALES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIA DO
EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA SEMENTE DE ABÓBORA (*Cucurbita maxima*)
E DA CUCURBITACINA E EM NEUTRÓFILOS HUMANOS**

MOSSORÓ
2025

JULIANNY ALMEIDA JALES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIA DO
EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA SEMENTE DE ABÓBORA (*Cucurbita maxima*)
E DA CUCURBITACINA E EM NEUTRÓFILOS HUMANOS**

Monografia apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Profa. Dra. Teresinha Silva de Brito

Co-orientador: Prof. Dr. Micássio Fernandes de Andrade

MOSSORÓ

2025

©Todos os direitos estão reservados à Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996, e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tornar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata, exceto as pesquisas que estejam vinculadas ao processo de patenteamento. Esta investigação será base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) seja devidamente citado e mencionado os seus créditos bibliográficos.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central Orlando Teixeira (BCOT)
Setor de Informação e Referência (SIR)

J26a Jales, Julianny.
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTI-
INFLAMATÓRIA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA SEMENTE
DE ABÓBORA (*Cucurbita maxima*) E DA CUCURBITACINA E
EM NEUTRÓFILOS HUMANOS / Julianny Jales. - 2025.
55 f. : il.

Orientadora: Teresinha De Brito.
Coorientador: Micássio De Andrade.
Monografia (graduação) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Curso de Biotecnologia,
2025.

1. Fitoterapia. 2. Triterpeno. 3. Glóbulos
brancos. 4. Espécies reativas de oxigênio. 5.
Fumaça de cigarro. I. De Brito, Teresinha, orient.
II. De Andrade, Micássio, co-orient. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada por sistema gerador automático em conformidade com AACR2 e os dados fornecidos pelo autor(a).

Biblioteca Campus Mossoró / Setor de Informação e Referência
Bibliotecária: Keina Cristina Santos Sousa e Silva
CRB: 15/120

JULIANNY ALMEIDA JALES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIA DO
EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA SEMENTE DE ABÓBORA (*Cucurbita maxima*)
E DA CUCURBITACINA E EM NEUTRÓFILOS HUMANOS**

Monografia apresentada à Universidade
Federal Rural do Semi-Árido como requisito
para obtenção do título de Bacharel em
Biotecnologia.

Defendida em: 17/ 07/ 2025.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Teresinha Silva de Brito (UFERSA)
Presidente

Profa. Dra. Ana Carla Diógenes Suassuna Bezerra (UFERSA)
Membro Examinador

Prof. Dr. Francisco Silvestre Brilhante Bezerra (UFERSA)
Membro Examinador

Gostaria de dedicar este trabalho à minha avó *Marlene Jales da Silva*, que foi uma pessoa importante em minha vida ao me ensinar ser uma pessoa esforçada e infelizmente foi uma vítima do câncer de pâncreas (*In Memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Acredito que sempre fui uma criança muito curiosa e cheia de perguntas para entender o motivo de como tudo realmente é, aquela criança que sonhava e imaginava muito alto, então meu primeiro agradecimento será destinada a minha pequena versão sonhadora e curiosa que me moldou para ser quem eu sou hoje, a responsável por me tornar a pesquisadora que sou hoje e eu sei que teria muito orgulho da minha atual versão. Esta mesma criança me levará mais longe do que eu possa imaginar, então terá meus eternos agradecimentos.

Agradeço a minha família por todo o apoio, suporte e conselhos durante essa jornada, principalmente minha mãe, Maria Joelma Almeida da Silva Jales, meu pai, Ubiratã Jales da Silva, minha irmã, Ana Júlia Almeida Jales, e ao meu irmãozinho, João Lucas Almeida Jales. Todos estiveram comigo desde o começo da graduação até o fim e sempre prestaram apoio aos meus objetivos e metas, além de comemorar minhas vitórias, como menção honrosa no XXX SEMIC, o prêmio de Empresária Júnior do ano de 2022 e meus próximos passos como pesquisadora. Infelizmente, eu não digo com frequência o quanto sou grata e os aprecio profundamente, mesmo diante das dificuldades, mas reconheço o quão longe eu fui por causa deles.

Agradeço a EMBASA, empresa júnior de Biotecnologia, por ter me aceito como membro em 2021 e ter me tornado a presidente em 2022. Acredito que minha jornada na empresa júnior me ajudou totalmente a evoluir como profissional diante a Biotecnologia e ao mercado de trabalho, assim como evolui completamente em âmbito pessoal. Atualmente, sou extremamente grata a formação e evolução que tive diante das experiências que a EMBASA me proporcionou, irei levar todos que estiveram presentes nessa trajetória e todas lembranças com muito carinho.

Agradeço aos meus professores que se fizeram presentes durante minha formação, aqueles que me inspiraram, me ensinaram, me aconselharam e me marcaram durante todos esses cinco anos de graduação. Todos fizeram parte do diferencial de me apaixonar completamente pela Biotecnologia, quando eu não tinha expectativa no início, e que todos me influenciaram a chegar no ponto em que estou. Especialmente, os professores Dra. Alessandra Fernandes Pereira, Dra. Ana Carla Diógenes Suassuna Bezerra, Dra. Cibele dos Santos Borges, Dr. Francisco Silvestre Brilhante Bezerra e Dr. Livio Carvalho de Figueiredo.

Agradeço ao laboratório Morfofisiopharmacologia por todos os conhecimentos, experiências, oportunidades e conselhos que me fizeram crescer como pesquisadora. Todos os membros do laboratório contribuíram para minha evolução, começando pelos professores Dr.

Emanuel Kennedy Feitosa Lima, Dr. Flávio Santos da Silva, Dr. Micássio Fernandes de Andrade e Dra. Teresinha de Silva Brito. Agradeço aos pós-graduandos que me ensinaram e me acompanharam durante toda a jornada acadêmica no laboratório, todos os conselhos e conversas foram fundamentais para meu desenvolvimento como pesquisadora e sou extremamente grata a todos. Agradeço também aos alunos de iniciação científica e estagiários do laboratório, agradeço pelos momentos de risada, de descontração, de leveza e pela amizade com todos.

Agradeço especialmente meus queridos pós-graduandos que me acompanharam tão de perto e se tornaram pessoas fundamentais, especiais, importantes e grandes amigos durante essa jornada. Agradeço a Amanda Estevam Carvalho, minha querida doutoranda, por ter ficado até tarde comigo no laboratório em todas as análises, por ter me aconselhado, por ter me ensinado, pela paciência, por ter me feito me apaixonar mais pela área da imunologia e os interessantes neutrófilos, pelas risadas e apoio. Agradeço também a Dra. Valéria Duarte de Almeida por ter me ensinado, por ter me aconselhado, por ter me apoiado, por sempre estar ao meu lado e desejando o melhor para mim.

Agradeço com muito carinho e extrema gratidão ao meu mestrando Antoniel de Oliveira Soares, por ter me aconselhado, por sua companhia, por sua compreensão, pela paciência, pelas risadas, pelo apoio, pela sinceridade, pelo esforço, pelo cuidado e carinho comigo durante toda esta jornada no nosso querido projeto. Agradeço imensamente por não só ter sido um grande exemplo de pós-graduando para mim, mas sim por ter se tornado um grande amigo no meio da loucura dos experimentos, mesmo diante dos dias em que não dava certo, mesmo diante das dificuldades do projeto. Agradeço Antoniel por ter me apoiado de início ao fim em todas as oportunidades, agradeço pelos abraços nos dias difíceis e eu tenho certeza que o levarei em meu coração com muita gratidão e amor. Muito obrigada, Antoniel, sem você não seria a mesma leveza, a mesma paixão e a mesma vontade de fazer pesquisa.

Agradeço à minha orientadora Dra. Teresinha de Silva Brito por ter aceito me orientar desde 2023, em todos esses dois anos agradeço pela paciência, pelos ensinamentos, pelos conselhos, pelas oportunidades, pela confiança e conversas que moldaram a pesquisadora que sou e serei. Deixo aqui meus sinceros agradecimentos por todos os momentos, por ter sido aquela que me fez ter a certeza que Farmacologia era meu lugar e que irei levar para toda a vida.

Agradeço ao meu co-orientador Dr. Micássio Fernandes de Andrade pela paciência, pelos ensinamentos, pelos conselhos, pela confiança e por ter inspirado minha trajetória para o mestrado. Sou eternamente grata ao senhor por me apoiar, por me apaixonar completamente

pela imunologia e os neutrófilos, por toda a confiança para que me tornasse independente nos experimentos. Obrigada por tudo, meus orientadores.

Finalizando os agradecimentos relacionados ao projeto e ao laboratório, agradeço ao Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Faculdade de Ciências da Saúde (UERN) por ter me recebido de braços abertos, pela confiança e pelos bons momentos durante todos os dias em que passava horas realizando os experimentos que concluíram meu Trabalho de Conclusão de Curso. Obrigada a todos os professores, técnicos, pós-graduandos e alunos vinculados ao laboratório.

Agradeço a banca examinadora por toda a disponibilidade, conselhos, correções, elogios e apoio, pois sempre foi um desejo meu que a minha banca fosse composta por profissionais que eu admirasse e me incentivaram. Agradeço aos professores Dra. Ana Carla Diógenes Suassuna Bezerra e Dr. Francisco Silvestre Brilhante Bezerra por todo suporte desde o início.

Agradeço aos meus amigos Arthur Mousinho de Andrade Veríssimo, Antonia Beatriz Mendonça Pereira, Caio César Araújo dos Santos e Yasmin Kawanny da Silva Carneiro por terem tornado a jornada acadêmica mais leve, engraçada e repleta de bons momentos mesmo diante da loucura que é a graduação. Agradeço especialmente Caio César Araújo dos Santos por todo suporte, por todos os conselhos, por todas as conversas, por ter me ouvido nos piores momentos, por me ajudar em todas as oportunidades, pela companhia e compreensão em todos os momentos, sou muito grata por tê-lo conhecido durante a graduação e pela nossa amizade, irei levá-la para a vida com muito carinho.

Agradeço imensamente e carinhosamente a Júlio César Cavalcante por ter sido tão importante, essencial, acolhedor, amigo, companheiro, apoiador, amoroso e insubstituível nessa jornada final para mim. Agradeço por todos esses anos em que estive comigo, me apoiando e cuidando de mim mesmo de longe, mas de uma maneira tão única e aconchegante que quero te levar para toda a vida ao meu lado. Muito obrigada por todo seu amor, cuidado, compreensão, sinceridade, conselhos, apoio nos piores e melhores momentos, esforço, risadas, leveza, diversão, carinho e aconchego nos momentos em que mais precisei. Desejo estar da mesma forma, sendo recíproca em cada mínimo detalhe, muito obrigada por tudo.

Agradeço também a todos os voluntários que cederam sangue durante todo o projeto, pois sem eles não teria sido possível realizar os experimentos e obter os resultados que me trouxeram até aqui.

Por fim, agradeço a Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) por ter sido como uma casa durante todos esses cinco anos, por todas as oportunidades que

proporcionou, por todas as vitórias conquistadas e por todos os conhecimentos que carregarei para o resto da minha vida. Agradeço imensamente a UFERSA por me proporcionar a oportunidade de conhecer todos os meus professores, meus orientadores, meus colegas de curso, meus amigos da graduação, meus queridos pós-graduandos, meu laboratório Morfofisiologia e por ter me feito a profissional que sou hoje.

Obrigada a todos, serão levados e lembrados com muito carinho.

O que realmente importa é o que você pensa de si mesmo. Se quer realmente algo ou alguém que realmente quer ser, o único que pode te atrapalhar é você mesmo.

Príncipe Arthur, Shrek Terceiro

RESUMO

A inalação da fumaça de cigarro pode causar um processo oxidativo e inflamatório no organismo humano, ocasionando uma resposta do sistema imunológico em conjunto com diversos danos. Os neutrófilos são células importantes e relevantes para a defesa primária do organismo, sendo capazes de formar Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos (NETs) e de produzir espécies reativas de oxigênio (ROS), agravando os danos causados pela fumaça de cigarro. *Cucurbita maxima* Duchesne, conhecida como abóbora, é usada como fonte alimentar, mas possui importância na medicina tradicional como planta medicinal por apresentar bioativos naturais, como os triterpenos, especificamente a Cucurbitacina E. As sementes apresentam potencial farmacológico, sendo descritos seus efeitos antimicrobiano, anti-inflamatório, antioxidante e analgésico. O objetivo do trabalho foi investigar a atividade antioxidante e anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico das sementes de *C. maxima* e o composto Cucurbitacina E em neutrófilos humanos. Foi utilizado cultivar comercial de *C. maxima* para obtenção do extrato hidroalcoólico. Os neutrófilos foram coletados de indivíduos saudáveis (não fumantes). Foram realizadas análises de citotoxicidade por meio de citometria de fluxo, mensuração de produção de ROS por citometria de fluxo, mensuração de produção de NETs, assim formando os seguintes grupos experimentais: Controle Negativo (CN), Controle Positivo (CP), Extrato da Fumaça de Cigarro (CSE: 3, 5 e 10 %), Extrato das Sementes de Abóbora (ESA: 0,01, 0,1 e 1 mg/mL), Cucurbitacina E (CuE: 1, 3 e 30 μ M). O ESA promoveu uma viabilidade celular acima de 90 % nas concentrações avaliadas, induzindo baixa porcentagem de morte celular (apoptose e necrose). O grupo CSE 10 % apresentou uma alta taxa de morte celular (90 %). O ESA, nas concentrações de 0,5 mg/mL e 1 mg/mL, foi capaz de inibir a produção de ROS em neutrófilos após estímulo com PMA ($p < 0,05$), demonstrando que as maiores concentrações avaliadas do ESA promoveram uma atividade antioxidante enquanto que CuE não apresentou atividade antioxidante em nenhuma das concentrações avaliadas ao não inibir significativamente a produção de ROS, assim como não comprovou uma atividade anti-inflamatória ao não reduzir significativamente a produção de NETs. O ESA não promove toxicidade em neutrófilos humanos nas concentrações avaliadas e proporciona um potencial antioxidante, contudo a CuE não apresenta potencial antioxidante e anti-inflamatória em neutrófilos humanos.

Palavras-chave: fitoterapia, triterpeno, glóbulos brancos, espécies reativas de oxigênio, fumaça de cigarro.

ABSTRACT

Inhalation of cigarette smoke can trigger oxidative and inflammatory processes in the human body, resulting in an immune system response alongside various types of damage. Neutrophils are important cells in the body's primary defense, capable of forming Neutrophil Extracellular Traps (NETs) and producing reactive oxygen species (ROS), which worsen the damage caused by cigarette smoke. *Cucurbita maxima* Duchesne, commonly known as pumpkin, is widely used as a food source but also holds significance in traditional medicine due to its natural bioactive compounds, such as triterpenes—specifically Cucurbitacin E. Its seeds have pharmacological potential, with reported antimicrobial, anti-inflammatory, antioxidant, and analgesic effects. This study aimed to investigate the antioxidant and anti-inflammatory activity of the hydroalcoholic extract of *C. maxima* seeds and the compound Cucurbitacin E on human neutrophils. A commercial cultivar of *C. maxima* was used to obtain the hydroalcoholic extract. Neutrophils were collected from healthy (non-smoking) individuals. Cytotoxicity was analyzed using flow cytometry, along with ROS production measurement by flow cytometry and NETs production assessment. The following experimental groups were established: Negative Control (NC), Positive Control (PC), Cigarette Smoke Extract (CSE: 3, 5, and 10%), Pumpkin Seed Extract (PSE: 0.01, 0.1, and 1 mg/mL), and Cucurbitacin E (CuE: 1, 3, and 30 μ M). The PSE promoted cell viability above 90% at all tested concentrations, inducing a low percentage of cell death (apoptosis and necrosis). The 10% CSE group showed a high rate of cell death (90%). PSE at concentrations of 0.5 mg/mL and 1 mg/mL inhibited ROS production in neutrophils after PMA stimulation ($p < 0.05$), demonstrating antioxidant activity at the highest concentrations tested. In contrast, CuE did not show antioxidant activity at any of the tested concentrations, as it did not significantly inhibit ROS production. It also did not exhibit anti-inflammatory activity, as it failed to significantly reduce NETs formation. PSE was not toxic to human neutrophils at the evaluated concentrations and demonstrated antioxidant potential, whereas CuE did not show antioxidant or anti-inflammatory potential in human neutrophils.

Keywords: Phytotherapy, triterpene, white blood cells, reactive oxygen species, cigarette smoke.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	–	Mecanismo de obtenção do extrato da fumaça de cigarro	44
Figura 2	–	Citotoxicidade celular do extrato da fumaça de cigarro...	21
Figura 3	–	Citotoxicidade celular nas concentrações de extrato de semente de abóbora...	23
Figura 4	–	Mensuração de produção de ROS estimulados por PMA 10^{-7} M e CSE 5%.	37
Figura 5	–	Avaliação do potencial de inibição de ROS por concentrações de ESA...	46
Figura 6	–	Avaliação do percentual de inibição de ROS pela ESA...	46
Figura 7	–	Avaliação do potencial de inibição de ROS pela CuE...	46
Figura 8	–	Avaliação do potencial de inibição de NETs pela CuE por 7 horas...	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
CSE	Extrato de Fumaça de Cigarro
MPO	Mieloperoxidase
NETs	Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos
NOX2	Complexo enzimático NADPH oxidase
COX	Complexo enzimático Ciclooxygenase
ESA	Extrato da Semente de Abóbora
CuE	Cucurbitacina E
DCFDA	Diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína
PMA	Phorbol-12-miristato-13-acetato
DPI	Difenileno-iodônio

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
NaCl	Cloreto de Sódio
NH ₄ Cl	Cloreto de Amônio
C°	Celsius

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	16
2.	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
2.1	A fumaça de cigarro e seus efeitos no organismo humano	18
2.2	Neutrófilos	20
2.3	O uso de plantas medicinais	23
2.4	<i>Cucurbita maxima</i> e Cucurbitacina E	24
3.	OBJETIVOS DA PESQUISA	26
3.1	Geral	26
3.2	Específicos	26
4.	MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1	Aspectos éticos e obtenção do sangue periférico	27
4.2	Obtenção do extrato hidroalcoólico da semente de abóbora (<i>Cucurbita maxima</i>)	27
4.3	Análise fitoquímica das sementes de <i>Cucurbita maxima</i>	27
4.4	Obtenção da Cucurbitacina E	28
4.5	Obtenção do extrato da fumaça de cigarro	28
4.6	Separação e preparação de neutrófilos	29
4.7	Teste de citotoxicidade por citometria de fluxo	20
4.8	Mensuração de produção de espécies reativas de oxigênio	29
4.9	Mensuração de produção de armadilhas extracelulares de neutrófilos	30
4.10	Análise estatística	31
5.	RESULTADOS	32
6.	DISCUSSÃO	40
7.	CONCLUSÃO	44
	REFERÊNCIAS	45

1. INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS, 2019), o tabagismo é uma das principais causa de morte, doença e empobrecimento, sendo um dos maiores perigos e desafios de saúde pública em escala mundial, pois causa cerca de 8 milhões de mortes por ano, sendo aproximadamente de 7 milhões por fumo direto e mais de 1,2 milhões indireto. A fumaça de cigarro, ao entrar em contato com os pulmões, ocasiona diversos processos de resposta como inflamação, estresse oxidativo e danos celulares, sendo a principal causa da Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) (Silva *et al.*, 2025).

A DPOC está relacionada com um grupo de doenças respiratórias, que possuem como característica principal a obstrução de vias aéreas, como a bronquite crônica e o enfisema pulmonar, tendo o tabagismo como principal origem. Atualmente, a DPOC é a terceira maior causa de morte no mundo, atingindo 100 milhões de mortes no século XX e tem uma estimativa de 1 bilhão de mortes no século XXI, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2020).

A exposição frequente à fumaça do cigarro ocasiona inflamação nos brônquios e alvéolos, o que acarreta em danos e, como consequência, liberação de radicais livres, que oxidam e destroem as estruturas celulares dos pulmões (Silva *et al.*, 2025). Quanto às vias aéreas centrais, os fumantes apresentam alterações inflamatórias crônicas de maneira proporcional ao número de células envolvidas na resposta inflamatória (Min; Huh; Moon., 2020).

As células do sistema imunológico que estão atuando diretamente nessa resposta inflamatória, capazes de se infiltrar nos alvéolos para contribuir com a inflamação após a exposição à fumaça de cigarro são os neutrófilos, os macrófagos e os linfócitos (Lee *et al.*, 2014). Os neutrófilos são a principal linha de defesa da resposta inata do sistema imunológico, constituindo entre 40% a 60% da população dos glóbulos brancos, sendo ativados através de estímulos por agentes como bactérias ou citocinas e quimiocinas, como TNF- α , GM-CSF, IL-8 e IFN- γ , e então encaminhados para o local de infecção ou inflamação (Wright *et al.*, 2010).

Existem tratamentos para redução da inflamação pulmonar e melhorar o fluxo de ar obstruído nas vias aéreas, porém a maioria deles visa à indução da broncodilatação e redução da sensação de falta de ar do paciente (Barnes, 2013; Bonnevie; Elkins, 2020; Onishi, 2017; Vestbo *et al.*, 2013), contudo nenhum é eficaz para modular a atividade das células do sistema imune. Nesse contexto, destaca-se a medicina tradicional com o uso de plantas medicinais, como a forma mais antiga de tratamento e prevenção de doenças (Yuan *et*

al., 2016), além de ser estrategicamente usada no desenvolvimento dos medicamentos convencionais que são, em sua maioria, originados de produtos naturais.

Cucurbita maxima Duchesne, conhecida popularmente como abóbora ou jerimum caboclo, membro da família Cucurbitaceae, é amplamente cultivada no mundo inteiro, principalmente em regiões tropicais, com o uso alimentar e medicinal (Wahid; Alqahtani; Alan Khan, 2021). As suas sementes são ricas em lipídios, proteínas, carboidratos e vitaminas como metabólitos primários e metabólitos secundários, como compostos fenólicos, flavonóides, taninos, saponinas, terpenóides, alcalóides (Caili; Huan; Quanhong, 2006). Dentre esses compostos, as cucurbitacinas, que são triterpenoides, possuem maior destaque devido ao seu potencial farmacológico com suas amplas propriedades como ação antimicrobiana (Muhammed; Noor Al-Mousawi; Khamis, 2025), anti-inflamatória (Paul *et al.*, 2025), antioxidante (Chen, 2012) e anticancerígena (Attard; Martinoli, 2015).

Mais especificamente, a Cucurbitacina E é um composto que apresenta diversas propriedades farmacológicas como ação antidiabética, antioxidante e anti-inflamatória, (Chen *et al.*, 2015; Paul *et al.*, 2025). Assim, considerando que a fumaça do cigarro é capaz de induzir estresse oxidativo em células humanas e que as células do sistema imunológico, como os neutrófilos, utilizam-se do processo de oxidação de biomoléculas como mecanismo efetor para defesa do organismo, propomos investigar a atividade antioxidante e anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico da semente de abóbora (*C. maxima*) e do composto Cucurbitacina E em neutrófilos humanos.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 A fumaça de cigarro e seus efeitos no organismo humano

O tabagismo é um dos fatores que têm influenciado diretamente na saúde da sociedade nos últimos quatro séculos, sendo um hábito vicioso. Ao decorrer dos anos, embora tenha leve redução entre adultos homens, aumentou entre jovens e mulheres, tornando-se um fator de desenvolvimento de doenças fatais e debilitantes (OPAS, 2024).

O consumo de cigarro é capaz de afetar múltiplos sistemas do corpo humano, estando mais relacionado ao sistema respiratório, como câncer do pulmão, enfisema pulmonar, bronquite crônica e DPOC (Silva *et al.*, 2025). A DPOC tem 90% dos casos associados a indivíduos fumantes ou ex-fumantes (Barnes, 2014), pois o ato de fumar é um grande fator de risco para desenvolver a DPOC, na qual envolve irregularidades das vias aéreas e/ou alveolares, como bronquite, bronquiolite e/ou enfisema, ocasionando uma obstrução persistente do fluxo de ar (Celli *et al.*, 2025).

A DPOC pode ser caracterizada por alterações patológicas nas pequenas vias aéreas como espessamento da parede das vias aéreas, aumento do estreitamento luminal e destruição da inserção alveolar, o que agrava a obstrução das vias aéreas e o enfisema (Higham *et al.*, 2025). A dificuldade respiratória é o sintoma mais característico da DPOC, pois é causada pelo aumento da resistência dessas vias (Higham *et al.*, 2025).

No entanto, o efeito negativo mais preocupante da exposição à fumaça de cigarro é a morte celular por apoptose ou necrose, pois ocorre um aumento exacerbado de estresse oxidativo, já que a fumaça de cigarro contém e produz diversas espécies reativas de oxigênio (ROS) (Ferraro *et al.*, 2023). Além disso, as ROS podem estimular a produção de citocinas inflamatórias ao aumentar sua transcrição gênica, o que acentua a inflamação do sistema respiratório (Domej; Oettl; Renner, 2014).

Em estudos experimentais, o método mais utilizado para obtenção de conhecimento sobre os danos relacionados ao tabagismo é a forma de extrato de fumaça de cigarro (CSE), que é um produto obtido através do borbulhamento da fumaça da queima do cigarro por um veículo líquido como solução salina, utilizado tanto em modelos animais como em meio de cultura de células (Menezes *et al.*, 2013). O estudo de Congping Li e colaboradores (2023) demonstrou as implicações do uso de extrato de fumaça de cigarro em modelos *in vivo* em camundongos e *in vitro* em células de linhagem A549, que resultou em danos nos tecidos pulmonares ocasionados pelo estresse oxidativo no modelo *in vivo* e houve uma redução na viabilidade celular e aumento em ROS produzidas no modelo *in vitro* (Li C. *et al.*, 2023).

A indução do processo inflamatório com o uso do extrato da fumaça de cigarro é um

meio comum para ativar células responsáveis pela resposta inflamatória, estas células irão produzir fatores pró e anti-inflamatórios e estimular a remodelação das vias aéreas, que irão induzir células do sistema imunológico para uma resposta imune como os neutrófilos (Celli *et al.*, 2025; Higham *et al.*, 2025).

2.2 Neutrófilos

Quando a resposta imunológica é estimulada, os neutrófilos, células do sistema imunológico inato, atuam como a primeira linha de defesa do organismo, sendo participantes da população de glóbulos brancos (Tonello *et al.*, 2025). Estas células são originadas na medula óssea, sendo produzidas e diferenciadas durante o processo de hematopoiese, no qual todas as células sanguíneas, incluindo as do sistema imunológico inato, são criadas (Amulic *et al.*, 2012). Aproximadamente 60% dos produtos da hematopoiese são dedicados aos neutrófilos (Mayadas; Cullere; Lowell, 2014).

Estas células possuem um tempo de vida relativamente curto, mas apresentam uma alta utilidade para diferentes tecidos do corpo humano, assim podendo estender o tempo de vida. Geralmente, na corrente sanguínea apresentam viabilidade celular de 8 horas a 12 horas, contudo em tecidos efetivos podem atingir de um dia a dois dias (Elahi, 2022; Dejas *et al.*, 2023). Este mecanismo de produção e rota dos neutrófilos torna a dinâmica celular mais fluida, por isso sua circulação pelo organismo é constante e apresenta sucesso para executar suas funções de acordo com sua morfologia e composição adequada (Jiang *et al.*, 2023).

Os neutrófilos maduros são polimorfonucleares segmentados (Kolaczowska; Kubes, 2013), este formato contribui para a execução das suas funções celulares, como a fagocitose, na qual os neutrófilos apresentam maior espaço para comportar os patógenos no citoplasma devido ao formato do núcleo, e a diapedese por causa do aumento da motilidade celular para atravessar os espaços estreitos entre a corrente sanguínea e os tecidos para chegar ao local de ação (Keenan *et al.*, 2021).

O citoplasma apresenta grânulos, que se formam durante a maturação destas células, sendo classificados em dois tipos principais: os grânulos azurófilos, que possuem atividade semelhante aos lisossomos, degradando o material fagocitado pelo neutrófilo (Donis-Maturano *et al.*, 2015); e os grânulos específicos que atuam como secretores, pois realizam a função inicial durante a resposta inflamatória (Eipper *et al.*, 2016).

Ambos se diferenciam de acordo com a presença ou ausência da mieloperoxidase (MPO), que está presente nos grânulos azurófilos enquanto nos específicos se apresenta ausente, sendo uma enzima importante para os leucócitos, pois participa diretamente da resposta imune e inflamatória, já que produz ROS para a eliminação de patógenos durante a fagocitose (Semenkova *et al.*, 2023).

A fagocitose é um processo realizado pelos glóbulos brancos, que englobam o patógeno para que seja degradado no interior do citoplasma da célula (Gordon, 2016). Durante a fagocitose, os mecanismos de defesa oxidativo e não oxidativo são ativados como a produção

de ROS como defesa oxidativa e a mobilização dos grânulos como defesa não oxidativa (Deleo; Allen, 2020).

A mobilização dos grânulos é conhecida como um processo de degranulação, no qual ocorre a produção ou liberação de substâncias pró-inflamatórias que estão presentes nestes grânulos após uma estimulação de receptores presentes na membrana do neutrófilo (Gao *et al.*, 2022). Durante a ativação de mediadores quando os neutrófilos são estimulados, como interleucina-8 (IL-8), lipopolissacarídeos e interferon- α com a proteína C5a, acaba produzindo uma rede de fibras extracelulares que são conhecidas como Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos (NETs) (Dinallo *et al.*, 2019; Long *et al.*, 2024).

As NETs são compostas pelo DNA dos neutrófilos, histonas e proteínas granulares antimicrobianas para que se possa capturar bactérias e eliminá-las, pois são capazes de se inserir nos tecidos (Reusch *et al.*, 2021). Ainda não há respostas sobre os mecanismos moleculares envolvidos na ativação e formação das NETs, porém é bem estabelecido que há participação de ROS no mecanismo e também do complexo NADPH-oxidase, mostrando a defesa inflamatória e oxidativa (Papayannopoulos *et al.*, 2010; Rosazza; Warner; Sollberger, 2021; Kolman *et al.*, 2022).

A geração de ROS como função de eliminar patógenos presentes no organismo é apresentada como uma explosão oxidativa após a fagocitose, que induz um grande consumo de oxigênio, sendo convertido em radicais de superóxido ao ativar o complexo enzimático NADPH oxidase, conhecida também como NOX2 (Winterbourn; Kettle; Hampton, 2016). A MPO irá gerar outros oxidantes para que possam atuar tanto na resposta imune, como na inflamatória e antimicrobiana, o que torna o processo citotóxico para células vizinhas por causa da alta exposição às ROS, podendo lisar as células próximas (Rayner; Love; Hawkins, 2014).

Ao se tratar de doenças pulmonares crônicas ou de infecções bacterianas, há um aumento de fluxo de neutrófilos no tecido durante o influxo pulmonar (Guzik *et al.*, 2011). Em caso de tabagismo que acarreta em uma condição fisiopatológica alterada, como a DPOC, existe uma relação entre o aumento do número de neutrófilos, a função pulmonar e o enfisema (Wang *et al.*, 2021). Essa relação pode ser explicada pela alteração anormal no mecanismo de apoptose dos neutrófilos, demonstrando que estas células apresentam maior duração de vida e sofrem necrose, o que pode acabar contribuindo para a inflamação característica da DPOC (Langereis *et al.*, 2010).

O mecanismo inflamatório da DPOC também é caracterizado pela quantidade exacerbada de ROS produzidas pelos neutrófilos após serem estimulados, normalmente uma

pequena quantidade é necessária para garantir a viabilidade celular, proteção e apoptose celular (Klaunig *et al.*, 2011; Vaguliene *et al.*, 2013). Contudo, as grandes quantidades de ROS no meio afetam a estrutura do DNA e modulam a expressão de um gene de estresse, o que contribui para o estresse oxidativo (Manevski *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2024; Salehi *et al.*, 2023; Klaunig *et al.*, 2011).

A atividade anormal dos neutrófilos na DPOC também inclui a liberação de NETs de maneira prejudicial, pois elas são capazes de ocasionar uma liberação explosiva de proteases, o que acaba agravando a condição da doença devido ao dano tecidual e mudanças mais favoráveis para patógenos como bactérias (Keir *et al.*, 2021; Long; Chalmers, 2022). Outras funções dos neutrófilos são comprometidas na condição da DPOC como redução na captura de patógenos durante os processos de fagocitose, diapedese prejudicada devido aos danos teciduais presentes e degranulação (Liew; Kubes, 2019).

Esses processos acentuados se tornam um resultado indesejado para o organismo e vem tomando destaque para pesquisas que possam inibir estes efeitos, procurando maneiras terapêuticas com substâncias antioxidantes e anti-inflamatórias.

2.3. O uso de plantas medicinais

A fitoterapia é uma forma terapêutica que utiliza derivados de plantas e plantas medicinais que possuem princípios ativos, que são capazes de tratar, prevenir e evitar enfermidades (Trojan-Rodrigues *et al.*, 2012). Essa terapia é antiga e apresenta um grande peso na história da medicina, os fitoterápicos são usados desde os primórdios da sociedade humana, muitas civilizações antigas possuíam visões terapêuticas diferentes sobre o uso de plantas medicinais.

Alguns exemplos históricos mais referenciados na literatura, trazem nomes de destaque como o Papiro Ebers, um antigo livro sobre o uso de plantas na medicina egípcia (1600 a.C), sendo o registro mais precedente da história da fitoterapia (Tahir *et al.*, 2021). Durante os períodos de conflitos e guerras, como a Guerra de Tróia (1200 a.C), destaca-se o uso de plantas medicinais como *Achillea millefolium* que foi utilizada para tratar soldados feridos, estancando ferimentos e curá-los (Ferreira *et al.*, 2014). Em contrapartida, na Grécia antiga (aproximadamente 400 a.C) os condenados à execução como Sócrates tiveram como pena de morte a ingestão de venenos extraídos de plantas, apresentando o lado fatal de algumas plantas devido sua alta toxicidade (Ferreira *et al.*, 2014).

A partir do uso antigo das plantas medicinais, a fitoterapia tornou-se uma prática bem consolidada na população, sendo relatado na literatura que aproximadamente 85% da população mundial utiliza plantas medicinais e fitoterápicos para fins terapêuticos (Mattos *et al.*, 2018). Seu uso se dá, dentre outras razões, pela falta de credibilidade na medicina alopática tradicional e pelo baixo custo do uso de plantas medicinais, sendo mais acessível para a população (Alves; Silva, 2003). Contudo, o uso a longo prazo e sem controle destas plantas podem ocasionar efeitos colaterais adversos como reações alérgicas, mutações, intoxicação, teratogênese, carcinogênese (Lu, W.; Lu, D., 2014).

Há muitas plantas com alto potencial terapêutico e bastante conhecidas na medicina tradicional e popular, o que aumenta o leque de possibilidades, como as espécies do gênero *Cucurbita*.

2.4 *Cucurbita maxima* e Cucurbitacina E

O gênero *Cucurbita* é um membro da família Cucurbitaceae, também conhecida como cucurbitáceas, sendo abundante nas Américas, principalmente países tropicais e subtropicais, contendo muitas espécies utilizadas para o consumo humano (Salehi *et al.*, 2019). Os produtos gerados da *Cucurbita* apresentam um importante papel nutricional, sendo uma boa fonte de vitaminas, além de estar bem consolidada na culinária, pois produz biscoitos, pães, sobremesas, sopas e bebidas (Dubey S. D.; Dubey S, 2012; Andolfo *et al.*, 2017;).

Estes produtos são ricos em carboidratos, proteínas e em vitamina C, piridoxina (B6) e riboflavina (B2), a gordura presente é insignificante, o que dá riqueza nutricional ao alimento (Adnan *et al.*, 2017). As partes mais ricas da *Cucurbita* são as sementes e as cascas comparadas com a polpa, as espécies *Cucurbita maxima* e *Cucurbita pepo* apresentaram níveis mais altos de carboidratos comparados com *Cucurbita moschata*. As sementes possuem uma grande quantidade de proteínas e gorduras, além de ser uma boa fonte de aminoácidos, apresentando 17 aminoácidos essenciais em sua composição (Kim *et al.*, 2012; Badr *et al.*, 2011).

As espécies comestíveis da *Cucurbita*, como *C. ficifolia*, *C. maxima*, *C. moschata* e *C. pepo* apresentam, dentre seus componentes, os bioativos naturais, sendo extremamente ricas em tocoferóis e carotenóides, especialmente as sementes e a casca da fruta, respectivamente (Kim *et al.*, 2012). Os carotenóides são bastante presentes no gênero *Cucurbita*, apresentando uma quantidade variável de uma espécie para outra, estando presente em maior quantidade na *C. maxima* (Chandrika *et al.*, 2010), *C. moschata* e *C. pepo* (Itle; Kabelka, 2009; Yoshida *et al.*, 2016; Borecka; Karas, 2025).

Segundo o estudo de Rezig e colaboradores (2012), o óleo de semente da *C. maxima* apresentou ser rica em tocoferóis, no qual δ -tocoferol se mostrou ser dominante em comparação com os outros. Sobre os compostos fenólicos, da mesma forma, apresenta uma quantidade variável de uma espécie para outra, porém apresenta uma quantidade baixa na maioria dos estudos. Como o estudo de Yang e colaboradores (2008) que mostrou a ausência de flavonóides em frutos imaturos e maduros de *C. maxima*. Já o estudo de Mien e Mohamed (2001) comprovou a presença de um flavonoide chamado kaempferol em uma alta concentração, 371.0 mg/kg na *C. maxima*.

Outras substâncias abundantes na família Cucurbitaceae são triterpenóides, chamados de cucurbitacinas, que apresentam mais de 18 tipos na natureza, sendo um grupo extremamente oxigenado (Borecka; Karas, 2025). Há diversos estudos que relatam o potencial farmacológico das cucurbitacinas como antitumorais, anti-inflamatórios, anti-ateroscleróticos,

antidiabéticos, imunomoduladores, neuroprotetora, hepatoprotetora e anti microbiana (Aeri; Kaushik; Mir, 2015; Silvestre; De Lucena; Da Silva Alves, 2022; Dai *et al.*, 2023).

As cucurbitacinas B, D e E isoladas da *C. andreana* mostraram ser capazes de inibir o crescimento e desenvolvimento de células tumorais da mama humana, cólon, pulmão e sistema nervoso central, além de também inibir a atividade das enzimas ciclooxigenase-1 (COX-1) e ciclooxigenase-2 (COX-2) e a peroxidação lipídica, mostrando ter potencial antitumoral e anti-inflamatório (Jayaprakasam; Seeram; Nair, 2003).

A Cucurbitacina E é um dos tipos de cucurbitacinas explorada na literatura, sendo usada em pesquisas para ação hepatoprotetora, neuroprotetora, anticancerígena, antidiabética, antioxidante, anti-inflamatória e entre outros (Hsu *et al.*, 2023; Chen *et al.*, 2015; Jayaprakasam; Seeram; Nair, 2003). Em estudo como de Zheng e colaboradores (2024), a cucurbitacina E foi usada para investigar o potencial anticancerígeno para inibir a proliferação de células cancerosas por apoptose através do mecanismo de disfunção mitocondrial regulada por ROS e da via de estresse do retículo endoplasmático, no qual mostrou efeito positivo.

A pesquisa de Abdelwahab e colaboradores (2011) realizou testes *in vitro* e *in vivo* com a cucurbitacina E a partir da *Citrullus lanatus* var. *citroides* para inibir a produção de espécies reativas de nitrogênio e a ação das enzimas COX-1 e COX-2 em macrófagos de rato e em ratos, apresentando resposta anti-inflamatória, na qual a cucurbitacina conseguiu inibir ambas as enzimas, mas com mais seletividade para COX-2, provando sua atividade farmacológica desejada.

Com isso, a cucurbitacina E se tornou uma substância de interesse para a presente pesquisa, visando investigar seu possível efeito antioxidante e anti-inflamatório em neutrófilos humanos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar a atividade antioxidante e anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico da semente de abóbora (*Cucurbita maxima*) e do composto Cucurbitacina E em neutrófilos humanos.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar qualitativamente o perfil fitoquímico das sementes de abóbora (*Cucurbita maxima*) e identificar os metabólitos secundários presentes.
- Avaliar a citotoxicidade do extrato hidroalcoólico da semente de abóbora (*Cucurbita maxima*) em neutrófilos humanos.
- Avaliar a atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico da semente de abóbora (*Cucurbita maxima*) e do composto Cucurbitacina E em neutrófilos humanos expostos ao extrato da fumaça de cigarro.
- Avaliar a atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico da semente de abóbora (*Cucurbita maxima*) e da Cucurbitacina E em neutrófilos humanos estimulados por PMA (Phorbol-12-miristato-13-acetato).
- Avaliar o potencial de inibição de NETs (Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos) pelo extrato hidroalcoólico da semente de abóbora e do composto Cucurbitacina E em neutrófilos humanos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Essa pesquisa é de caráter experimental e foi desenvolvida no Laboratório de Morfofisiofarmacologia do Departamento Ciências da Saúde da UFERSA, Laboratório de Engenharia Genética e Proteômica (UFERSA) e Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Faculdade de Ciências da Saúde (UERN).

Todos os sais, drogas e reagentes utilizados nesta pesquisa foram de alto grau de pureza analítica, obtidos das companhias Sigma Chemical Corporation (St. Louis, Missouri, USA), Merck (Darmstadt, Germany) ou Reagen (Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

4.1 Aspectos éticos e obtenção do sangue periférico

Participaram da pesquisa voluntários saudáveis não-fumantes com idade entre 18 e 40 anos, ambos os sexos e que não estavam fazendo tratamento medicamentoso. Foram conscientizados sobre os objetivos da pesquisa e assinaram o termo de consentimento Livre e Esclarecido. Foram coletadas alíquotas de 20 mL de sangue dos participantes por punção venosa na região da fossa cubital por técnico capacitado, utilizando material estéril e descartável, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UERN (CEP-UERN: 5.998.798).

4.2 Obtenção do extrato hidroalcoólico da semente de abóbora (*Cucurbita maxima*)

Foi utilizado um exemplar obtido de sementes de cultivar comercial Moranga Coroa adquiridas no mercado local de Mossoró-RN, registro número 02241 (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), cedido pela Profa. Dra. Lindomar Maria da Silveira do Departamento de Ciências Agrônômicas e Florestais.

As sementes foram limpas e secas. Após o processo de secagem, foram trituradas em moinho. Em seguida, foram pesadas e submetidas a maceração hidroalcoólica (70%) durante 10 dias com agitação diária. O extrato hidroalcoólico resultante foi concentrado em um evaporador rotatório (50 °C) e banho-maria (40 °C) e, posteriormente, liofilizado para obtenção do extrato bruto (Matos, 1997). O extrato obtido foi mantido em freezer -20°C, protegido da luz.

4.3 Análise fitoquímica das sementes de *Cucurbita maxima*

A análise fitoquímica qualitativa das sementes de *Cucurbita maxima* foi realizada através da metodologia descrita por Matos (2008), em que foi realizada a trituração das sementes para que o pó fosse submetido a reações colorimétricas, de precipitação e

fluorescência. Dessa forma, o teste de fluorescência foi realizado para as cumarinas, reação da cianidina ou shinoda para os flavonoides, reação de cloreto férrico para fenóis, os testes com os reagentes de Wagner e o reagente de Bertrand para alcalóides, a reação de Borträger para as antraquinonas, o teste de espuma para as saponinas, o teste de precipitação por gelatina para taninos livres e o teste de Stiasny para taninos condensados e hidrolisáveis. Devido a indisponibilidade do reagente diclorometano, não foi possível a análise da presença ou ausência de triterpenos na amostra. Esta análise foi realizada no Laboratório de Parasitologia de Diagnóstica e Experimental (LPDE) na UFERSA.

4.4 Obtenção da Cucurbitacina E

A Cucurbitacina E, com grau de pureza $\geq 95\%$ (HPLC), foi obtida diretamente da empresa de produtos químicos Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA).

4.5 Obtenção do extrato da fumaça de cigarro

O extrato da fumaça de cigarro foi obtido através de um método adaptado (Oldenburger *et al.*, 2012), no qual um cigarro (Marlboro, sem filtros removidos) foi incinerado e a sua fumaça foi tragada por um mecanismo adaptado (Figura 01) de um tubo falcon, com 20ml de meio HBSS. A fumaça entrou em contato com o meio líquido quando a seringa puxou o ar atmosférico, assim obtendo o extrato da fumaça de cigarro concentrado e, em seguida, foi realizada a leitura em espectrofotômetro para se obter a absorbância de 320nm. A solução foi nomeada como 100% e diluída em meio HBSS para obter as soluções trabalhadas de 3%, 5% e 10% (Barbosa de Oliveira *et al.*, 2023).

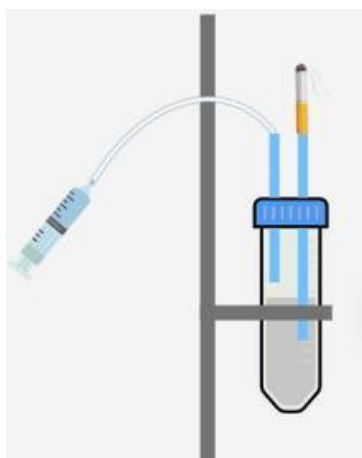


Figura 01: Mecanismo de obtenção do extrato da fumaça de cigarro, com o cigarro incinerado no topo, em contato indireto com 20ml de meio RPMI no interior do tubo falcon, e a seringa acoplada para tragar a fumaça. Fonte: Autoria própria.

4.6 Separação e preparação de neutrófilos

O sangue colhido foi transferido a tubos falcon de 50 mL contendo 20 mL de alsever e centrifugado (2500 rpm, 10 minutos, Acell 0, Brake 0 a 25°C). O plasma e as células mononucleares presentes foram descartadas e a região mais densa, contendo os granulócitos, foi diluída em NaCl 0,15 com gelatina 2,5 % (gelatina Difco™) (Pedrosa; Leal; Lemes, 2021) e deixada em repouso por 10 minutos em banho-maria, assim o sobrenadante foi utilizado e transferido para tubos de fundo redondo, enquanto o restante foi desprezado. Os tubos foram centrifugados novamente (2200 rpm, 10 minutos, Acell 5, Brake 5 a 25 °C), em seguida, as hemácias presentes foram lisadas com NH₄Cl 0,83% por 5 minutos (37 °C em banho-maria). As células foram centrifugadas outra vez (2200 rpm, 10 minutos, Acell 5, Brake 5 a 25 °C), lavadas com NaCl, e em seguida foram suspensas em solução de meio HBSS com 0,1% de gelatina. A contagem das células foi realizada na câmara de Neubauer, diluída em solução de Turk, para a análise de viabilidade por citometria de fluxo, mensuração de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e mensuração de inibição de Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos (NETs).

4.7 Teste de citotoxicidade por citometria de fluxo

A viabilidade celular foi avaliada por citometria de fluxo para detecção de apoptose e necrose dos neutrófilos usando os marcadores Anexina-V e Iodeto de propídeo (PI), respectivamente. Em uma câmara de fluxo laminar, os neutrófilos, antes separados e preparados após contagem, foram submetidos aos seguintes grupos, em duplicatas: Gate, células em meio HBSS; Controle Negativo (CN), células com marcadores de morte celular; Controle Solvente (CS), células em 2% de DMSO; Extrato da Fumaça de Cigarro (CSE) nas concentrações de 3%, 5% e 10%; Extrato da Semente de Abóbora (ESA) nas concentrações de 0,01, 0,1 e 1 mg/mL.

Assim, as amostras foram mantidas em uma incubadora de CO₂ a 37°C durante 7 horas. Após esse período, foi realizada a análise de apoptose e necrose por citometria de fluxo.

4.8 Mensuração de produção de espécies reativas de oxigênio

Os neutrófilos foram divididos nos seguintes grupos: Gate (G), células diluídas em meio HBSS; Controle Negativo (CN), células diluídas em meio HBSS com adição da sonda DCFDA (diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína); Controle Positivo (CP), células diluídas em meio HBSS com adição de PMA (Phorbol-12-miristato-13-acetato) e sonda DCFDA; Controle Solvente (CS), células diluídas em meio HBSS com adição de DMSO a 2% e sonda

DCFDA; CSE 5%, células diluídas em meio HBSS com adição de CSE a 5% e sonda DCFDA; CSE 5% + DPI, células diluídas em meio HBSS com adição de CSE a 5%, DPI (difenileno-iodônio) e sonda DCFDA; Extrato da Semente de Abóbora (ESA) nas concentrações de 0,01, 0,1, 0,3 e 1 mg/mL a CSE 5% e sonda DCFDA para triagem; Cucurbitacina E (CuE) nas concentrações de 1, 3 e 30 μ M a CSE 5% e sonda DCFDA para triagem.

As células foram submetidas à aclimação celular e incubadas por 15 minutos a 37°C, os reagentes foram preparados: PMA (Phorbol-12-miristato-13-acetato), que foram adicionados 20 mL de HBSS em um tubo falcon e 2 μ l de PMA; DPI (difenileno-iodônio), que foram adicionados 2000 μ l de HBSS em um eppendorf e 4 μ l de DPI; Sonda DCFDA (diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína), que foram adicionados 3000 μ l de HBSS em um tubo falcon e 12 μ l da sonda DCFDA em ambiente escuro por ser fotossensível. Em seguida, cada grupo, menos a Gate, tiveram a adição de 250 μ l da sonda para serem incubados por 20 minutos a 37°C e centrifugados por 5 minutos em seguida.

Logo após, os tratamentos foram adicionados, como PMA, DPI, CSE, as concentrações do extrato da semente de abóbora (ESA) e as concentrações da cucurbitacina E (CuE) para serem incubados novamente por 30 minutos a 37°C e centrifugados por 5 minutos após a adição de HBSS, o sobrenadante foi descartado e depois mais HBSS é adicionado, depois as amostras foram lidas no citômetro. Após os resultados da triagem, foram estabelecidas cinco concentrações de ESA para o cálculo de IC₅₀, nas quais são 0,01, 0,05, 0,1, 0,5 e 1 mg/mL.

4.9 Mensuração de produção de Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos

Os neutrófilos foram divididos nos seguintes grupos: Controle Negativo (CN), células diluídas em meio HBSS; Controle Positivo (CP): células diluídas em meio RPMI com adição de PMA (Phorbol-12-miristato-13-acetato); Extrato da Fumaça de Cigarro (CSE) nas concentrações de 3 e 5%; CSE + DPI, na qual as concentrações de 3 e 5% com a adição de DPI (difenileno-iodônio); Extrato da Semente de Abóbora (ESA) nas concentrações de 0,01 e 0,5 mg/mL com adição de CSE 3% e 5% em cada concentração; Cucurbitacina E (CuE) nas concentrações de 1 e 30 μ M com a adição de CSE 3% e 5% em cada concentração.

Os reagentes foram preparados após a divisão dos grupos da seguinte maneira: PMA (Phorbol-12-miristato-13-acetato) em um tubo falcon com 20 mL de meio HBSS para adicionar 2 μ l de PMA para obter a solução intermediária; DPI (difenileno-iodônio) em um tubo falcon de 15 mL com 2000 μ l de meio HBSS para adicionar 4 μ L de DPI para obter a segunda solução intermediária.

Após a adição de todos os reagentes e todos os tratamentos em seus respectivos grupos, ocorreu a incubação durante 7 horas em banho-maria (37°C) para a adição, em cada grupo, de 2,5 µL de DNase, que foi preparada a partir de 1500 µL de HBSS em um tubo falcon de 15 mL para adicionar 0,5 µL de DNase. Por fim, foram adicionados 50 µL de EDTA em cada grupo para serem submetidos à centrifugação por 5 minutos para que o sobrenadante seja coletado e foi armazenado em um freezer -80°C até o momento da mensuração através de um espectrofluorímetro (Fluoromax) associado a um leitor de placa de 96 poços (MicroMax 384), como uma análise quantitativa do material genético liberado pelos neutrófilos através da sonda fluorescente PicoGreen (Duarte de Almeida *et al.*, 2021).

4.10 Análise estatística

A maior parte dos valores foi expressada pelas médias aritméticas $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.), com a representação do número de observações experimentais (n). Para comparação dos resultados entre os grupos experimentais das análises, foi realizada análise de variância (ANOVA) seguida de um teste de múltipla comparação, conforme apropriado. A significância estatística foi considerada quando a probabilidade de ocorrência da hipótese de nulidade for menor que 5% ($p < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas pelo programa GraphPad Prism 8 (**GraphPad Prism version 8.0, San Diego, CA**).

5. RESULTADOS

5.1 Perfil fitoquímica das sementes de *Cucurbita maxima*

Após a realização da análise fitoquímica qualitativa, foram apresentados como metabólitos secundários presentes nas sementes de *C. maxima*: alcalóides, flavonóides do tipo flavonas e taninos do tipo condensados (Tabela 01).

Tabela 01: Dados da análise fitoquímica qualitativa de metabólitos secundários nas sementes de *C. maxima* e a atividade biológica relatada na literatura.

Metabólito Secundário	Presença (+) ou Ausência (-)	Atividade biológica
Alcalóides	+	Anticancerígena, imunomoduladora, antiviral, anti-inflamatória, analgésica e antimicrobiana (Adamski <i>et al.</i> , 2020).
Antraquinonas	-	Anticancerígena, anti-tumor, anti-inflamatória, antifúngica e antimicrobiana (Diaz-Muñoz <i>et al.</i> , 2018).
Cumarinas	-	Anti-tumor, anti-inflamatória, antiviral e antimicrobiana (Zhu; Jiang, 2018).
Fenóis	-	Antioxidante e antimicrobiana (Saini <i>et al.</i> , 2024).
Flavonóides	+	Antioxidante, anti-inflamatória, analgésica, anti-tumoral, antimicrobiana, anti-ansiedade e antidiabética (Hao <i>et al.</i> , 2024).
Saponinas	-	Anti-inflamatória, antioxidante, imunomoduladora, antimicrobiana e antifúngica (Desai, S; Desai, D; Kaur 2009)
Taninos	+	Antimicrobiana, antioxidante, antiviral e antitumoral (Bruyne <i>et al.</i> , 1999)

Fonte: Autoria própria.

5.2 Teste de citotoxicidade por citometria de fluxo

É possível observar que os grupos G, CSE 3% e CSE 5% apresentaram viabilidade acima de 90% após a análise de 4 amostras em duplicatas, indicando que não há citotoxicidade. Contudo, o grupo CSE 10% apresentou viabilidade de apenas $15,62\% \pm 22,80\%$, indicando uma alta porcentagem de apoptose em relação aos demais ($p < 0,05$). Dessa forma, como esta concentração apresentou um potencial citotóxico para os neutrófilos, não foi utilizada nos protocolos subsequentes (Figura 02).

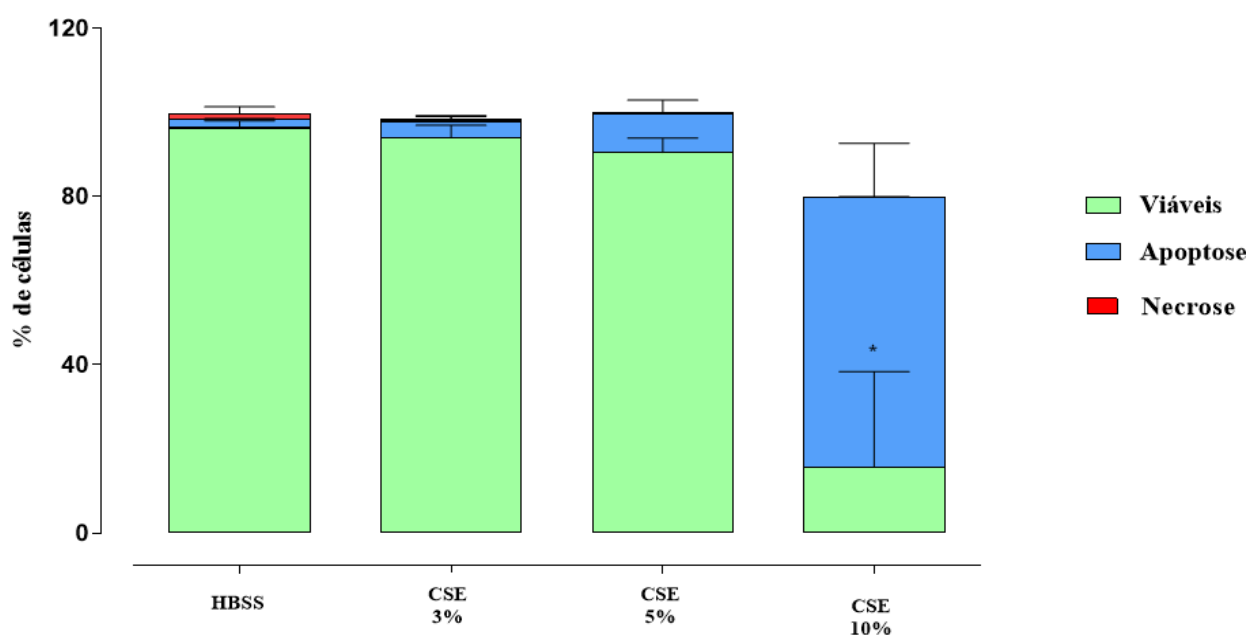


Figura 02: Citotoxicidade celular do extrato da fumaça de cigarro: Avaliação da citotoxicidade celular das concentrações de CSE 3%, 5% e 10%. Abreviaturas: G (Gate), CSE 3%, CSE 5% e CSE 10% (Extrato da Fumaça de Cigarro). Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão ($p < 0,05$). Símbolo * expressa diferença estatística. One-way ANOVA teste de Tukey. Gráfico gerado através do *software Graphpad prism*.

Em relação ao ESA nas concentrações de 0,01, 0,1 e 1 mg/mL, observa-se que os grupos CS, ESA 0,01, 0,1 e 1 mg/mL apresentaram viabilidade acima de 90%, indicando que não há citotoxicidade ($p > 0,05$) (Figura 03).

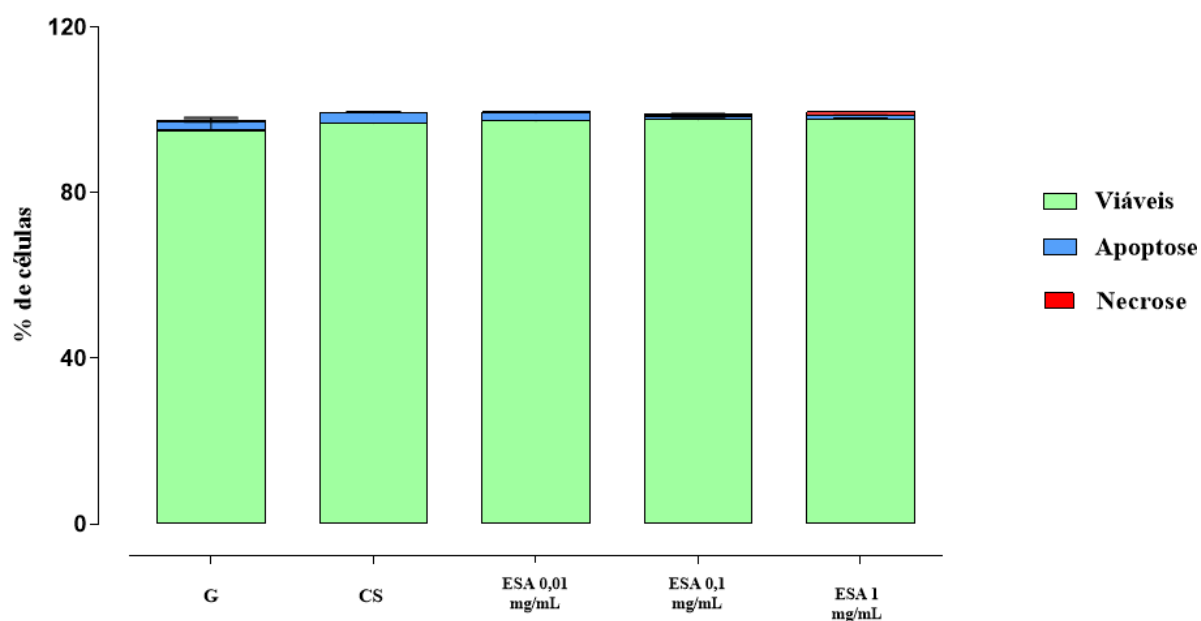


Figura 03: Citotoxicidade celular do extrato da semente de abóbora: Avaliação da citotoxicidade celular das concentrações de ESA 0,01, 0,1 e 1 mg/mL. Abreviaturas: G (Gate), CS (Controle Solvente), ESA 0, 01, ESA 0,1 e 1 mg/mL (Extrato da Semente de Abóbora). Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão ($p > 0,05$). One-way ANOVA teste de Tukey. Gráfico gerado através do *software Graphpad prism*.

5.3 Mensuração da produção de Espécies Reativas de Oxigênio

O potencial de produção de ROS para os grupos CN, CP (PMA) e CSE 5% foi calculado a partir da Mediana de Intensidade de Fluorescência (MFI) a partir de 3 amostras em duplicatas. Ao observar a figura 04, nota-se que o grupo CP apresenta a produção de ROS esperada de $1,2 \times 10^7 \pm 3,1 \times 10^6$ pela adição de PMA 10^{-7} M em comparação com CN e CSE 5% ($p < 0,05$). Contudo, o CSE 5% não apresentou uma produção satisfatória de ROS como estímulo comparado ao CP, se assemelhando ao CN ($p > 0,05$).

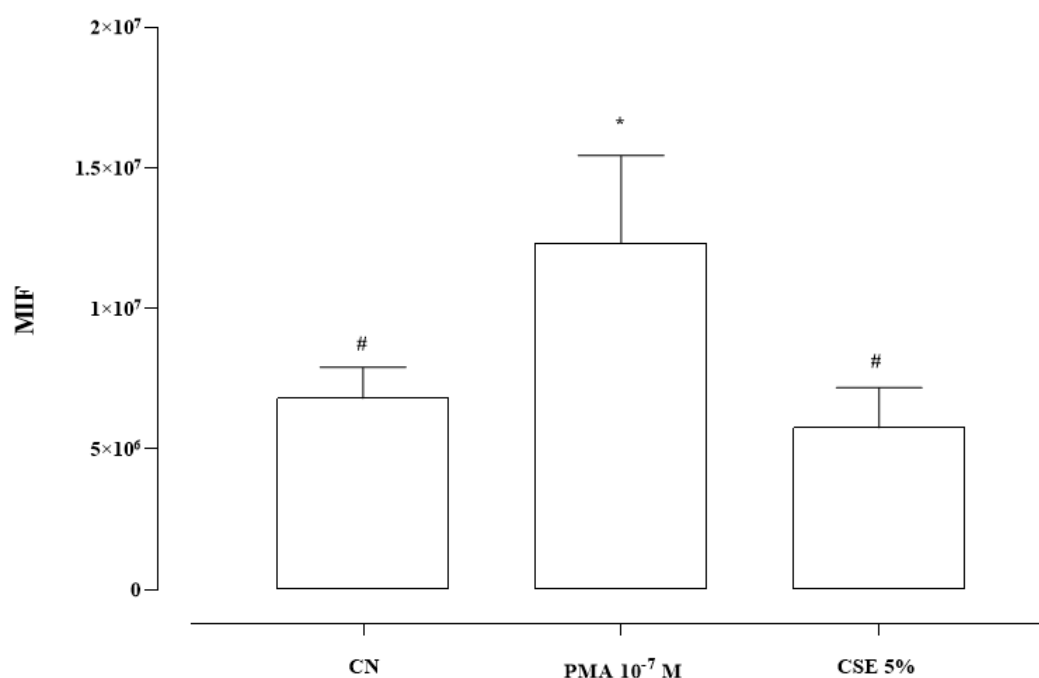


Figura 04: Mensuração de produção de ROS estimulados por PMA 10^{-7} M e CSE 5%: Avaliação da mensuração de produção de ROS estimulados por PMA 10^{-7} M e CSE 5%. Abreviaturas: CN (Controle Negativo) e CSE 5% (Extrato da Fumaça de Cigarro). Símbolos diferentes expressam diferença estatística ($p < 0,05$). One-way ANOVA teste de Tukey. Gráfico gerado através do *software Graphpad prism*.

Uma vez que o CSE 5% não estimulou uma quantidade significativa de ROS, optou-se induzir a produção de ROS com o PMA 10^{-7} M, visto este ser considerado padrão na produção de ROS (Damascena *et al.*, 2022).

Em seguida, foi realizado uma triagem das concentrações de ESA 0,01, 0,1 e 1 mg/mL para investigar o potencial antioxidante calculado a partir da Mediana de Intensidade de Fluorescência (MFI) em função dos grupos CN, CP, ESA 0,01, 0,1 e 1 mg/mL através de 3 amostras em duplicatas. Foi possível observar que o grupo ESA 1 mg/mL apresentou uma redução significativa $2,3 \times 10^5 \pm 1,4 \times 10^5$ da produção de ROS em relação ao grupo CP $1,2$

$\times 10^7 \pm 3,1 \times 10^6$, indicando um possível potencial antioxidante ($p < 0,05$). Enquanto que nas demais concentrações, não houve uma diferença significativa em relação ao grupo CP ($p > 0,05$) (Figura 05).

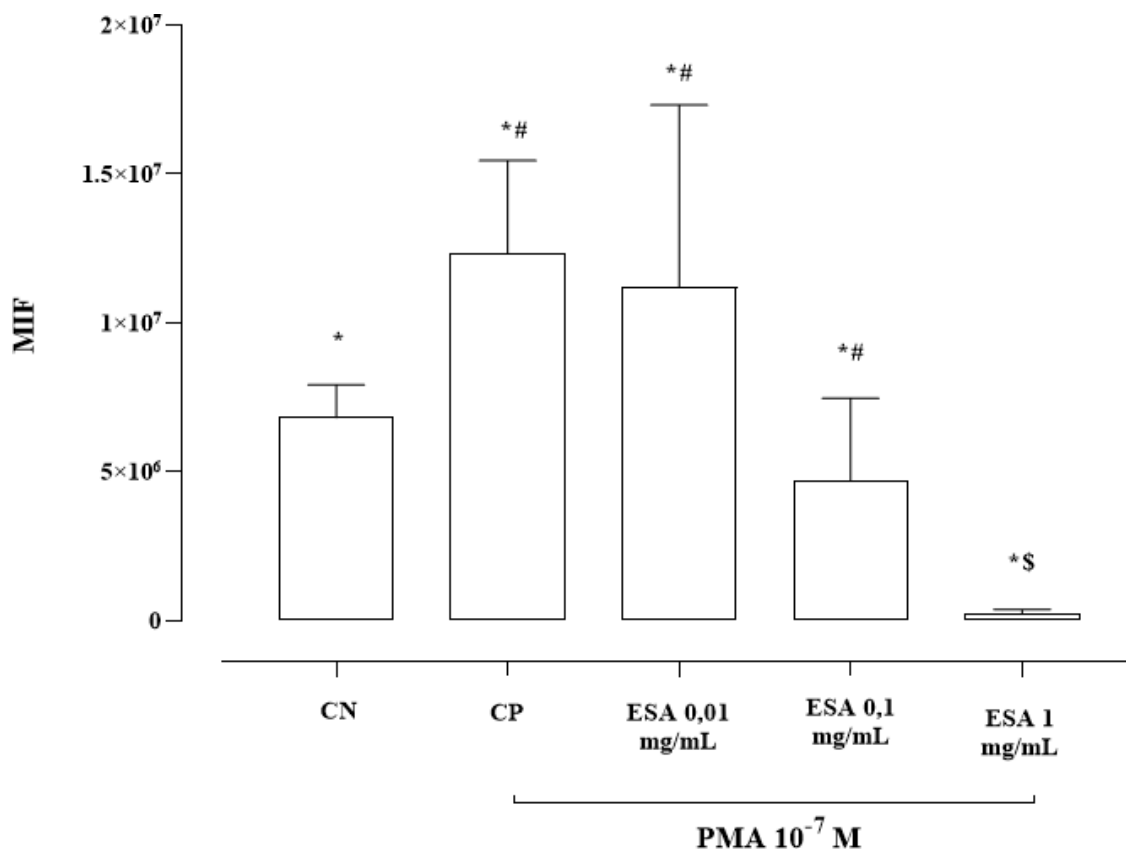


Figura 05: Avaliação do potencial de inibição de ROS por concentrações de ESA: Avaliação do potencial de inibição de ROS por concentrações de ESA. Abreviaturas: CN (Controle Negativo), CP (Controle Positivo), ESA 0,01, 0,1 e 1 mg/mL (Extrato de Semente de Abóbora). Símbolos diferentes expressam diferença estatística ($p < 0,05$). One-way ANOVA teste de Tukey. Gráfico gerado através do *software Graphpad prism*.

A partir dos resultados obtidos e indicados na figura 05, foi realizado o cálculo da concentração inibitória 50% (IC50) através de cinco concentrações de ESA (0,01, 0,05, 0,1, 0,5 e 1 mg/mL) a partir de 9 amostras em duplicatas. Observou-se que o ESA apresentou um efeito concentração dependente ($p < 0,05$) com valor de IC50 de $0,172 \pm 0,120$ mg/mL (Figura 06).

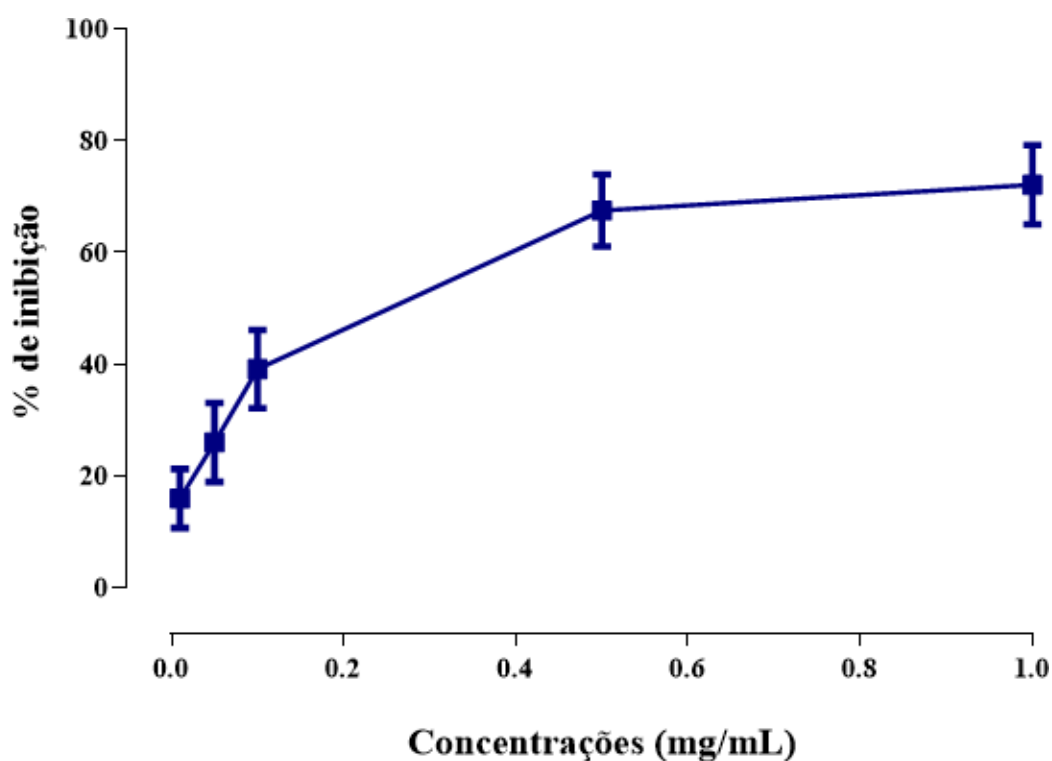


Figura 06: Curva concentração efeito do percentual de inibição de ROS por ESA: O gráfico mostra inibição concentração dependente do ESA na produção de ROS em neutrófilos humanos. Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão ($p < 0,05$). One-way ANOVA teste de Tukey. Gráfico gerado através do *software Graphpad prism*.

O potencial antioxidante da CuE foi avaliado a partir dos grupos CN, CP, DPI, CuE 1, 3 e 30 μ M através de 3 amostras em duplicatas. Observou-se que todos os grupos tratados com CuE não apresentaram uma diferença significativa em relação ao grupo CP, indicando que a CuE não possui potencial antioxidante para inibir a produção de ROS em comparação ao grupo DPI que apresentou valores de $1,2 \times 10^6 \pm 6,6 \times 10^4$ ($p > 0,05$) (Figura 07).

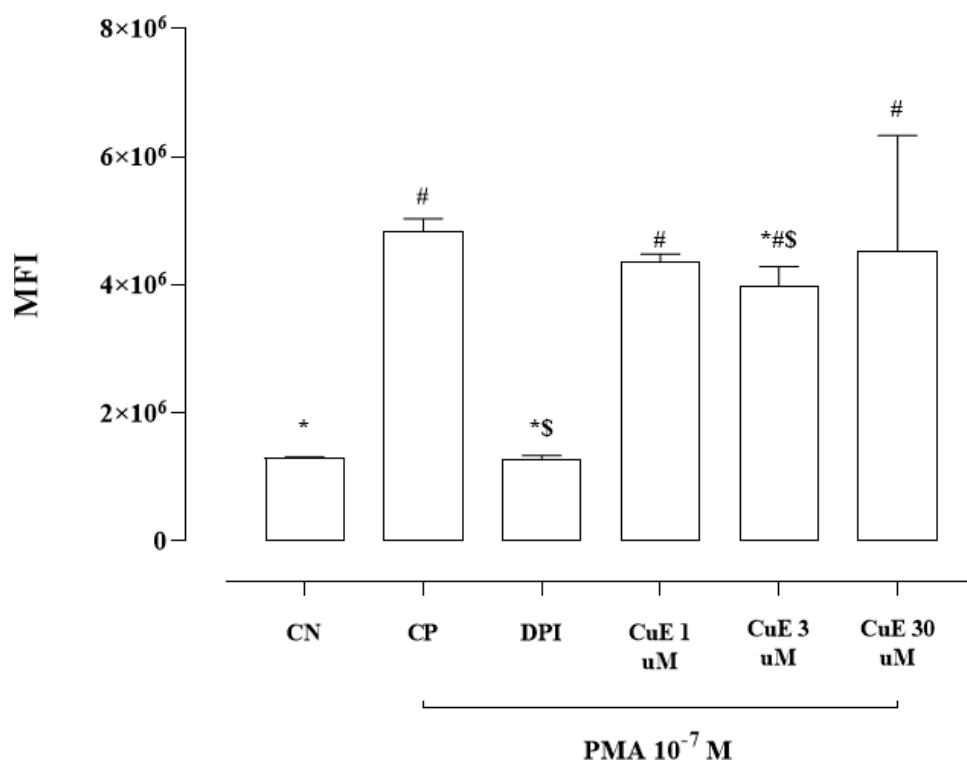


Figura 07: Avaliação do potencial de inibição de ROS pela CuE: Avaliação do potencial de inibição de ROS por diferentes concentrações de CuE. Abreviaturas: CN (Controle Negativo), CP (Controle Positivo), DPI (Controle DPI), CuE 1, 3 e 30 μ M (Cucurbitacina E). Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão. Símbolos diferentes expressam diferença estatística ($p > 0,05$). One-way ANOVA teste de Tukey. Gráfico gerado através do *software Graphpad prism*.

5.4 Mensuração da produção de Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos

O potencial anti-inflamatório da CuE foi avaliado a partir dos valores de liberação de DNA em função dos grupos CN, CP, CSE 3%, CSE 5%, DPI, CuE 1 e 30 μ M por 6 amostras em duplicatas. Dessa forma, é possível notar que o grupo CN apresenta uma diferença significativa de produção de NETs esperada de 24,64 ng/mL $\pm$ 3,86 ng/mL em comparação com CP de 313,3 ng/mL $\pm$ 212,8 ng/mL e CSE 5% 280,7 ng/mL $\pm$ 164,6 ng/mL ($p < 0,05$). Em contrapartida, os demais grupos não apresentaram diferenças significativas na inibição de NETs, indicando que não há resposta anti-inflamatória da CuE nas concentrações avaliadas em um tempo de incubação de 7 horas ($p > 0,05$) (Figura 08).

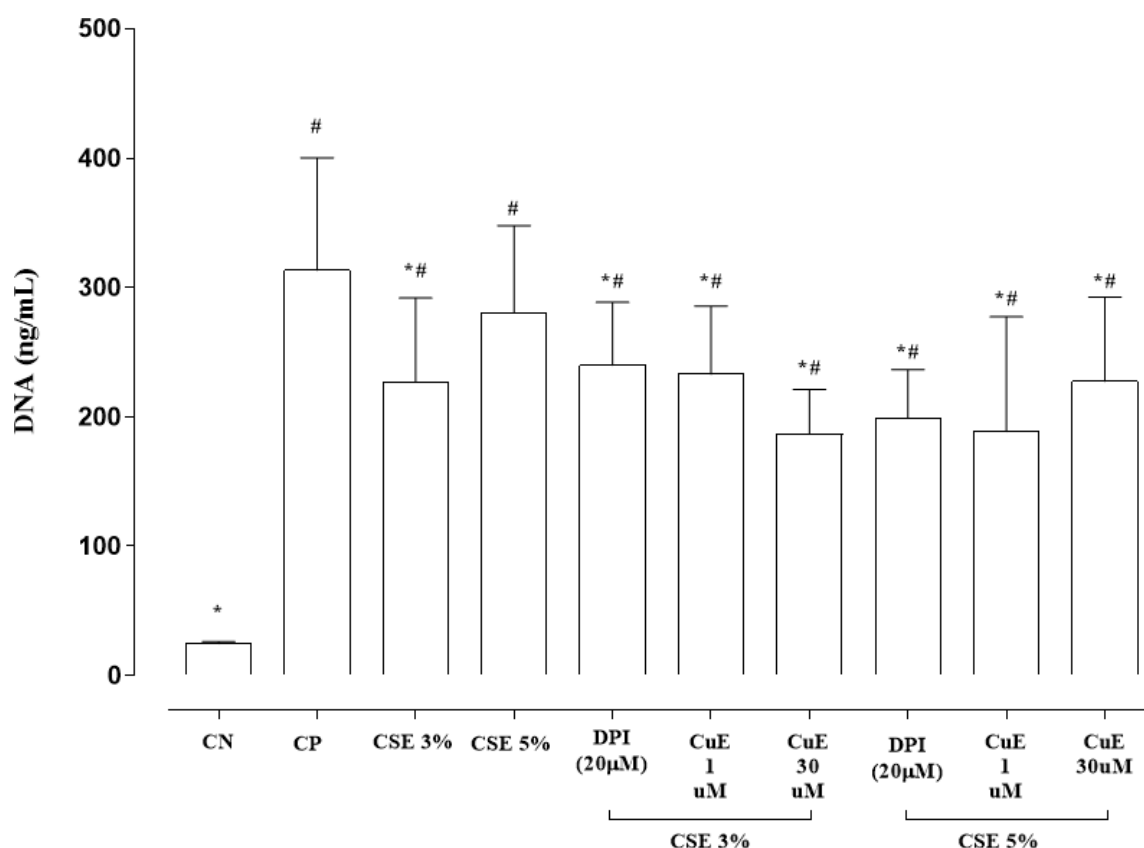


Figura 08: Avaliação do potencial de inibição de NETs pela CuE por 7 horas: Avaliação do potencial de inibição de NETs por concentrações de CuE. Abreviatura: CN (Controle Negativo), CP (Controle Positivo), CSE 3% e 5% (Extrato da Fumaça de Cigarro), DPI (Controle DPI), CuE 1 e 30 μ M (Cucurbitacina E). Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão. Símbolos diferentes expressam diferença estatística ($p > 0,05$). Kruskal-Wallis teste de Dunn. Gráfico gerado através do *software Graphpad prism*.

6. DISCUSSÃO

A abóbora (*Cucurbita maxima* Duchesne), pertencente à família das cucurbitáceas, é uma espécie amplamente cultivada no Brasil e tradicionalmente utilizada como fonte alimentar e para fins medicinais (Wahid; Alqahtani; Alan Khan, 2021). Suas sementes são ricas em lipídios e proteínas com grande quantidade de compostos bioativos como vitaminas, antioxidantes e cucurbitacinas (Caili; Huan; Quanhong, 2006). Logo, o presente estudo teve como objetivo investigar a atividade antioxidante e anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico da semente de abóbora (*Cucurbita maxima*) e do terpeno tetracíclico esteróide Cucurbitacina E em neutrófilos humanos.

No presente estudo, o extrato de semente de abóbora (ESA) não indicou efeito citotóxico sobre os neutrófilos humanos nas concentrações testadas, sendo a maior concentração de 1 mg/mL. Em seguida, foi possível avaliar a atividade antioxidante de ESA, que apresentou um efeito concentração-dependente a partir das concentrações 0,5 e 1 mg/mL ao inibir significativamente a produção de ROS.

Por outro lado, a CuE nas concentrações avaliadas no presente estudo não apontou potencial antioxidante, visto não inibir de maneira significativa a produção de ROS, da mesma forma em que não apresentou uma resposta anti-inflamatória por não ser capaz de inibir a produção de NETs em um período de 7 horas. Embora o efeito antioxidante e anti-inflamatório da CuE seja descrito na literatura (Peters *et al.*, 1997 ; Hussein *et al.*, 2017), seus efeitos em neutrófilos humanos precisam ser melhor investigados, pois há estudos que relatam que metabólitos como saponinas e cucurbitacinas (E, B e R) são capazes de afetar a liberação e ativação dos neutrófilos (Andrade *et al.*, 2024).

Através da análise do perfil fitoquímico qualitativo das sementes de *C. maxima*, a resposta antioxidante de ESA pode estar relacionada com a presença dos metabólitos secundários flavonóides do tipo flavonas e taninos do tipo condensados, por ambos apresentarem atividade antioxidante (Hao *et al.*, 2024; Bruyne *et al.*, 1999). Não foi possível realizar a reação de Salkowski para triterpenos durante a análise fitoquímica, contudo há estudos na literatura que confirmam a riqueza de triterpenos nas sementes de *C. maxima* (Md, P.; Md, T., 2017).

O que leva a interpretar a relação entre o resultado negativo da CuE e o resultado positivo de ESA referente ao potencial antioxidante, ESA apresenta uma atividade antioxidante que pode não depender da CuE, mas sim de outros metabólitos secundários ou outras substâncias presentes no extrato.

De acordo com os dados obtidos sobre a citotoxicidade de ESA, foi aparente o alto

percentual de neutrófilos viáveis em relação ao basal. Corroborando com outros estudos descritos na literatura que apontam que o extrato hidroalcoólico da semente de *C. maxima* não apresenta toxicidade, sendo considerado seguro (Md, P.; Md, T., 2017). Contudo, um fator importante a se ressaltar é a relação entre o solvente DMSO utilizado para diluir o extrato e os neutrófilos.

O estudo de Elisia e colaboradores (2016) mostrou que o DMSO possui um comportamento de ser capaz de reduzir o recrutamento de neutrófilos de maneira sistemática em camundongos com artrite, mas não é capaz de afetar significativamente a viabilidade celular de acordo com estudo *in vitro* realizado. Dessa maneira, quanto aos baixos percentuais de morte celular na presença do ESA reportados no presente estudo, o DMSO pode ser o responsável por essas pequenas taxas de apoptose e necrose nas concentrações testadas de ESA.

Ao analisar os dados de citotoxicidade do extrato da fumaça de cigarro (CSE), é possível notar a diferença entre as concentrações de 3% e 5% e a concentração de 10%, devido a redução significativa da viabilidade celular na maior concentração e o aumento de neutrófilos que sofreram apoptose, indicando que a relação neutrófilo e CSE é concentração-dependente. Há dados que confirmam que fumantes compulsivos (>15 cigarros/dia), possuem uma viabilidade de neutrófilos menor que indivíduos não-fumantes (Agarwal; Baron; Mehta, 2016).

Quando os neutrófilos estão em contato com CSE durante um tempo de incubação de 120 minutos (2 horas), há a indução de uma morte celular atípica que apresenta características de apoptose, autofagia e necrose (Guzik *et al.*, 2011), justificando os achados no presente estudo. Há a presença de sinais moleculares que indicam o começo da apoptose, mas não é apresentada seu processo comprometido, o que confirma dados na literatura que mostram que os neutrófilos apoptóticos são representados como uma pequena população de leucócitos em todas as doenças ocasionadas pelo tabagismo (Matute-Bello *et al.*, 1997; Droemann *et al.*, 2000).

Enquanto há outros dados que confirmam uma redução significativa de neutrófilos que sofrem apoptose espontânea tanto em fumantes saudáveis, indivíduos com DPOC e não fumantes (Pletz *et al.*, 2004). Além de modificar o padrão de morte celular dos neutrófilos, o CSE também é capaz de alterar outras funcionalidades dos neutrófilos como a capacidade de capturar patógenos para eliminá-los (Guzik *et al.*, 2011).

Muitos indivíduos fumantes apresentam uma maior suscetibilidade em contrair doenças infecciosas como a pneumonia, sendo recorrente para pacientes com DPOC, podendo estar

relacionada com a incapacidade de captura dos patógenos (Labandeira-Rey *et al.*, 2007; Stringer *et al.*, 2007; Bagaitkar; Demuth; Scott, 2008). Estudos apontam que a exposição exacerbada da fumaça de cigarro nos neutrófilos prejudicou a capacidade fagocítica em comparação a indivíduos não-fumantes (Agarwal; Baron; Mehta, 2016), além disso Chien e colaboradores (2020) apontam a capacidade de captura e eliminação da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* em função do tempo e concentração é considerada reduzida significativamente.

Ao se tratar de uma exposição contínua e acentuada, a função dos neutrófilos pode estar comprometida desde sua produção e maturação. Durante a granulopoiese dos neutrófilos na medula óssea, ocorreram mudanças transcricionais que envolvem a funcionalidade das células, como degranulação, apresentação de antígenos e sinalização de interleucinas antes de sua maturação enquanto progenitoras granulócitos-macrófagos (GMPs) (Kapellos *et al.*, 2023). Após a maturação, uma grande concentração de neutrófilos são enviados para o sangue periférico e para os respectivos tecidos e órgãos completamente afetados (Schwartz; Weiss, 1994; Alkhedaide, 2020).

Devido aos resultados obtidos ao utilizar CSE como estímulo de ROS, recorreu ao uso de PMA 10^{-7} M (Phorbol-12-miristato-13-acetato), apresentado na literatura como reagente que mais estimula a produção de ROS e NETs em neutrófilos (Damascena *et al.*, 2022). O extrato hidroalcoólico indicou atividade antioxidante com maior clareza após o estímulo com PMA, confirmando o potencial antioxidante das sementes de *C. maxima* corroborando com dados descritos sobre diferentes extratos, como aquoso, etanólico e acetônico (Ethiraj; Balasundaram, 2016).

Em suma, o presente estudo abordou limitações diante da metodologia utilizada para mensurar a produção de ROS com o uso da sonda DCFDA (diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína). Há estudos que confirmam o amplo uso de DCFDA para quantificar por fluorescência as ROS produzidas em meio intracelular, contudo a concentração e tempo de exposição da sonda deve ser limitado (Eruslanov; Kusmartsev, 2010). Ao afetar estes fatores, a sonda DCFDA pode resultar em uma oxidação fotoquímica artificial e confundir com os resultados reais de geração de ROS, não sendo recomendado (Eruslanov; Kusmartsev, 2010).

Diante disso, o modelo de estudo observou que 30 minutos de incubação após estimular os neutrófilos com CSE era um tempo curto de estimulação, além de CSE afetar as funcionalidades das células. Desta forma, foi necessário utilizar o PMA 10^{-7} M para investigar o potencial antioxidante das substâncias testadas.

Contudo, o atual estudo visa mudanças de metodologias que possam investigar mais

devidamente a atividade antioxidante e anti-inflamatória de ESA e CuE, como recorrer a metodologia do teste de nitroazul tetrazólio (NBT) e reduzir o tempo de incubação da produção de NETs de 7 horas para 4 horas.

O teste NBT é utilizado para mensurar a produção de ROS em neutrófilos através da formação de cristais e mudança de coloração nos poços de uma placa, sendo lidos em seguida por um leitor de microplacas para calcular a absorbância do produto final (Baisya *et al.*, 2023). Esta metodologia é amplamente utilizada na literatura, apresentando muitos estudos com neutrófilos, como o estudo de Baisya e colaboradores (2023) que mediu a atividade do complexo enzimático NADPH-oxidase, responsável por produzir ROS em neutrófilos, em pacientes com Lúpus para analisar os graus de gravidade da doença.

Os dados obtidos sobre a produção de NETs apresentam uma produção exagerada, o que acaba dificultando na interpretação dos dados e avaliar o potencial anti-inflamatório das substâncias estudadas. Na literatura, há estudos que demonstram que o tempo de 4 horas de incubação, há uma produção efetiva de NETs com diferentes estímulos e tratamentos para investigar o potencial de inibição (Amulic *et al.*, 2017; Gray *et al.*, 2018; Folco *et al.*, 2018). Logo, uma redução neste tempo poderá fazer uma diferença significativa na interpretação dos dados e analisar a atividade de ESA e CuE.

7. CONCLUSÃO

A partir dos dados apresentados, pode-se observar que as sementes de *C. maxima* apresentam a presença de taninos condensados, alcaloides e flavonoides do tipo flavonas. Além disso, ESA promoveu uma viabilidade celular acima de 90 % nas concentrações avaliadas enquanto que o extrato da fumaça de cigarro (CSE) não apresenta ser um bom estímulo para produção de ROS em neutrófilos por seu caráter prejudicial às células. Em contrapartida, ao utilizar um novo estímulo, o extrato da semente de abóbora (ESA) apresenta atividade antioxidante através das concentrações 0,5 mg/mL e 1 mg/mL ao inibir significativamente a produção de ROS em neutrófilos humanos. Contudo, a Cucurbitacina E (CuE) não apresenta atividade antioxidante e anti-inflamatória em nenhuma das concentrações utilizadas em neutrófilos humanos.

Dessa maneira, pode-se concluir que ESA não apresenta potencial citotóxico para os neutrófilos e possui uma atividade antioxidante ao inibir a produção de ROS em neutrófilos humanos. Porém, serão necessários mais estudos para analisar de maneira mais profunda e complexa sobre a atividade de ESA como estudos *in vivo* para compreender a atuação sistêmica da substância.

REFERÊNCIAS

- Abdelwahab, S. I. *et al.* Anti-inflammatory activities of cucurbitacin E isolated from *Citrullus lanatus* var. *citroides*: Role of reactive nitrogen species and cyclooxygenase enzyme inhibition. **Fitoterapia**, v. 82, n. 8, p. 1190–1197, 2011.
- Adamski, Z. *et al.* Biological activities of alkaloids: From toxicology to pharmacology. **Toxins**, v. 12, n. 4, p. 210, 2020.
- Adnan, M. *et al.* A review on the ethnobotany, phytochemistry, pharmacology and nutritional composition of *Cucurbita pepo* L. J. **Phytopharm**, v. 6, p. 133–139, 2017.
- Aeri, V.; Kaushik, U.; Mir, S. Cucurbitacins - An insight into medicinal leads from nature. **Pharmacognosy reviews**, v. 9, n. 17, p. 12, 2015.
- Agarwal, C.; Baron, T. K.; Mehta, D. S. Hidden truth of circulating neutrophils (polymorphonuclear neutrophil) function in periodontally healthy smoker subjects. **Journal of Indian Society of Periodontology**, v. 20, n. 2, p. 157–160, 2016.
- Alkhedaide, A. Q. Tobacco smoking causes secondary polycythemia and a mild leukocytosis among heavy smokers in Taif City in Saudi Arabia. **Saudi journal of biological sciences**, v. 27, n. 1, p. 407–411, 2020.
- Alves, A. R.; Silva, M. J. P. DA. O uso da fitoterapia no cuidado de crianças com até cinco anos em área central e periférica da cidade de São Paulo. **Revista da Escola de Enfermagem da U S P**, v. 37, n. 4, p. 85–91, 2003.
- Andolfo, G. *et al.* Draft of zucchini (*Cucurbita pepo* L.) proteome: A resource for genetic and genomic studies. **Frontiers in genetics**, v. 8, 2017.
- Andrade, M. L. de O. *et al.* Apodanthera glaziovii (Cucurbitaceae) shows strong anti-inflammatory activity in Murine models of acute inflammation. **Pharmaceutics**, v. 16, n. 10, 2024.
- Amulic, B. *et al.* Neutrophil function: From mechanisms to disease. **Annual review of immunology**, v. 30, n. 1, p. 459–489, 2012.
- Amulic, B. *et al.* Cell-cycle proteins control production of neutrophil extracellular traps. **Developmental cell**, v. 43, n. 4, p. 449–462.e5, 2017.
- Attard, E.; Martinoli, M.-G. Cucurbitacin E, an experimental lead triterpenoid with anticancer, immunomodulatory and novel effects against degenerative diseases. A mini-review. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 15, n. 17, p. 1708–1713, 2015.

Badr, S. E. A. *et al.* Chemical composition and biological activity of ripe pumpkin fruits (*Cucurbita pepo* L.) cultivated in Egyptian habitats. **Natural Product Research**, v. 25, n. 16, p. 1524–1539, 2011.

Bagaitkar, J.; Demuth, D. R.; Scott, D. A. Tobacco use increases susceptibility to bacterial infection. **Tobacco induced diseases**, v. 4, p. 12, 2008.

Baisya, R. *et al.* Evaluation of NADPH oxidase (NOX) activity by nitro blue tetrazolium (NBT) test in SLE patients. **Mediterranean Journal of Rheumatology**, v. 34, n. 2, p. 163–171, 2023.

Barbosa de Oliveira, M. C. *et al.* Modulation of alveolar macrophage activity by eugenol attenuates cigarette-smoke-induced acute lung injury in mice. **Antioxidants** (Basel, Switzerland), v. 12, n. 6, p. 1258, 2023.

Barnes, P. J. New anti-inflammatory targets for chronic obstructive pulmonary disease. *Nature reviews*. **Drug discovery**, v. 12, n. 7, p. 543–559, 2013.

Bonnevie, T.; Elkins, M. Chronic obstructive pulmonary disease. **Journal of Physiotherapy**, v. 66, n. 1, p. 3–4, jan. 2020.

Borecka, M.; Karaś, M. A comprehensive review of the nutritional and health-promoting properties of edible parts of selected Cucurbitaceae plants. **Foods** (Basel, Switzerland), v. 14, n. 7, p. 1200, 2025.

Bruyne, T. D. *et al.* Condensed vegetable tannins: Biodiversity in structure and biological activities. **Biochemical systematics and ecology**, v. 27, n. 4, p. 445–459, 1999.

Caili, F. U.; Huan, S.; Quanhong, L. I. A review on pharmacological activities and utilization technologies of pumpkin. **Plant foods for human nutrition** (Dordrecht, Netherlands), v. 61, n. 2, p. 70–77, 2006.

Celli, B. R. *et al.* Current smoker: A clinical COPD phenotype affecting disease progression and response to therapy. **American journal of respiratory and critical care medicine**, 2025.

Chandrika, U. G. *et al.* Carotenoid content and in vitro bioaccessibility of lutein in some leafy vegetables popular in Sri Lanka. **Journal of nutritional science and vitaminology**, v. 56, n. 3, p. 203–207, 2010.

Chen, X *et al.* Biological activities and potential molecular targets of cucurbitacins: a focus on cancer. **Anticancer Drugs**, New York, v. 23, p. 777–787, 2012.

Chen, J.-C. *et al.* The Antigluconeogenic Activity of Cucurbitacins from *Momordica charantia*. **Planta medica**, v. 81, n. 04, p. 327–332, 2015.

Chien, J. *et al.* Cigarette smoke exposure promotes virulence of *Pseudomonas aeruginosa* and induces resistance to neutrophil killing. **Infection and immunity**, v. 88, n. 11, 2020.

Dai, S. *et al.* Cucurbitacin B: A review of its pharmacology, toxicity, and pharmacokinetics. **Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society**, v. 187, n. 106587, p. 106587, 2023.

Damascena, H. L. *et al.* Neutrophil activated by the famous and potent PMA (phorbol myristate acetate). **Cells** (Basel, Switzerland), v. 11, n. 18, p. 2889, 2022.

Dejas, L. *et al.* Regulated cell death in neutrophils: From apoptosis to NETosis and pyroptosis. **Seminars in immunology**, v. 70, n. 101849, p. 101849, 2023.

Deleo, F. R.; Allen, L.-A. H. Phagocytosis and neutrophil extracellular traps. **Faculty reviews**, v. 9, p. 25, 2020.

Desai, S. D.; Desai, D. G.; Kaur, H. Saponins and their biological activities. **Pharma Times**, v. 41, n. 3, p. 13-16, 2009.

Diaz-Muñoz, G. *et al.* Anthraquinones: An Overview. **Studies in Natural Products Chemistry**. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 313–338.

Dinallo, V. *et al.* Neutrophil extracellular traps sustain inflammatory signals in ulcerative colitis. **Journal of Crohn's & colitis**, v. 13, n. 6, p. 772–784, 2019.

Donis-Maturano, L. *et al.* Prolonged exposure to neutrophil extracellular traps can induce mitochondrial damage in macrophages and dendritic cells. **SpringerPlus**, v. 4, n. 1, p. 161, 2015.

Domej, W.; Oetl, K.; Renner, W. Oxidative stress and free radicals in COPD--implications and relevance for treatment. **International journal of chronic obstructive pulmonary disease**, v. 9, p. 1207–1224, 2014.

Droemann, D. *et al.* Decreased apoptosis and increased activation of alveolar neutrophils in bacterial pneumonia. **Chest**, v. 117, n. 6, p. 1679-1684, 2000.

Duarte de Almeida, V. *et al.* Neutrophils from patients with the cardiac clinical form of Chagas disease release less NETs than neutrophils from healthy individuals. **Parasite Immunology**, v. 43, p. 1/12821-6, 2021.

Dubey, S. D.; Dubey, S. Overview on Cucurbita maxima. **International Journal of Phytopharmacy**, v. 2, n. 3, p. 68-71, 2012.

Eipper, S. *et al.* Lactoferrin is an allosteric enhancer of the proteolytic activity of cathepsin G. **PloS one**, v. 11, n. 3, p. e0151509, 2016.

Elahi, S. Hematopoietic responses to SARS-CoV-2 infection. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, v. 79, n. 3, p. 187, 2022.

Elisia, I. *et al.* DMSO represses inflammatory cytokine production from human blood cells and reduces autoimmune arthritis. **PloS one**, v. 11, n. 3, p. e0152538, 2016.

Eruslanov, E.; Kusmartsev, S. Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. **Methods in molecular biology** (Clifton, N.J.), v. 594, p. 57–72, 2010.

Ethiraj, S.; Balasundaram, J. Phytochemical and biological activity of Cucurbita seed extract. **J Adv Biotechnol**, v. 6, n. 1, p. 813-21, 2016.

Ferraro, M. *et al.* Formoterol exerts anti-cancer effects modulating oxidative stress and epithelial-mesenchymal transition processes in cigarette smoke extract exposed lung adenocarcinoma cells. **International journal of molecular sciences**, v. 24, n. 22, p. 16088, 2023.

Ferreira, T. S. *et al.* Phytotherapy: an introduction to its history, use and application. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 16, n. 2, p. 290–298, 2014.

Folco, E. J. *et al.* Neutrophil extracellular traps induce endothelial cell activation and tissue factor production through interleukin-1 α and cathepsin G. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 38, n. 8, p. 1901–1912, 2018.

Gao, X. *et al.* Multiple death pathways of neutrophils regulate alveolar macrophage proliferation. **Cells** (Basel, Switzerland), v. 11, n. 22, p. 3633, 2022.

Gordon, S. Phagocytosis: An immunobiologic process. **Immunity**, v. 44, n. 3, p. 463–475, 2016.

Gray, R. D. *et al.* Delayed neutrophil apoptosis enhances NET formation in cystic fibrosis. **Thorax**, v. 73, n. 2, p. 134–144, 2018.

Guzik, K. *et al.* Cigarette smoke-exposed neutrophils die unconventionally but are rapidly phagocytosed by macrophages. **Cell death & disease**, v. 2, n. 3, p. e131, 2011.

Hao, B. *et al.* Advances in flavonoid research: Sources, biological activities, and developmental perspectives. **Current issues in molecular biology**, v. 46, n. 4, p. 2884–2925, 2024.

Higham, A. *et al.* Histopathology of the small airways: Similarities and differences between ageing and COPD. **Pulmonology**, v. 31, n. 1, p. 2430032, 2025.

Hsu, H.-L. *et al.* Cucurbitacin E exerts anti-proliferative activity via promoting p62-dependent apoptosis in human non-small-cell lung cancer A549 cells. **Current issues in molecular biology**, v. 45, n. 10, p. 8138–8151, 2023.

Hussein, M. A. *et al.* Synthesis of cinnamyl and caffeoyl derivatives of cucurbitacin-eglycoside isolated from *Citrullus colocynthis* fruits and their structures antioxidant and anti-inflammatory activities relationship. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 18, n. 8, p. 677–693, 2017.

Jayaprakasam, B.; Seeram, N. P.; Nair, M. G. Anticancer and antiinflammatory activities of cucurbitacins from *Cucurbita andreana*. **Cancer letters**, v. 189, n. 1, p. 11–16, 2003.

Itle, R. A.; Kabelka, E. A. Correlation between L*a*b* color space values and carotenoid content in pumpkins and squash (*Cucurbita spp.*). **HortScience: a publication of the American Society for Horticultural Science**, v. 44, n. 3, p. 633–637, 2009.

Jiang, J. *et al.* Neutrophil-to-lymphocyte ratio and platelet-to-lymphocyte ratio are early predictors of bronchopulmonary dysplasia. **Medicine**, v. 102, n. 35, p. e34987, 2023.

Kapellos, T. S. *et al.* Systemic alterations in neutrophils and their precursors in early-stage chronic obstructive pulmonary disease. **Cell reports**, v. 42, n. 6, p. 112525, 2023.

Keenan, C. R. *et al.* Chromosomes distribute randomly to, but not within, human neutrophil nuclear lobes. **iScience**, v. 24, n. 3, p. 102161, 2021.

Keir, H. R. *et al.* Neutrophil extracellular traps, disease severity, and antibiotic response in bronchiectasis: an international, observational, multicohort study. *The Lancet. Respiratory medicine*, v. 9, n. 8, p. 873–884, 2021.

Kim, M. Y. *et al.* Comparison of the chemical compositions and nutritive values of various pumpkin (*Cucurbitaceae*) species and parts. **Nutrition research and practice**, v. 6, n. 1, p. 21, 2012.

Klaunig, J. E. *et al.* Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 254, n. 2, p. 86–99, 2011.

Kolaczowska, E.; Kubes, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature reviews. Immunology*, v. 13, n. 3, p. 159–175, 2013.

Kolman, J. P. *et al.* NET release of long-term surviving neutrophils. **Frontiers in immunology**, v. 13, p. 815412, 2022.

Labandeira-Rey, M. *et al.* Staphylococcus aureus Pantón-Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia. **Science**, v. 315, n. 5815, p. 1130–1133, 2007.

Langereis, J. D. *et al.* Abrogation of NF- κ B signaling in human neutrophils induces neutrophil survival through sustained p38-MAPK activation. **Journal of leukocyte biology**, v. 88, n. 4, p. 655–664, 2010.

Lee, H. *et al.* Inhibitory effects of *Stemona tuberosa* on lung inflammation in a subacute cigarette smoke-induced mouse model. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 14, n. 1, p. 513, 2014.

Liew, P. X.; Kubes, P. The neutrophil's role during health and disease. **Physiological reviews**, v. 99, n. 2, p. 1223–1248, 2019.

Long, M. B.; Chalmers, J. D. Treating neutrophilic inflammation in airways diseases. **Archivos de bronconeumologia**, v. 58, n. 6, p. 463–465, 2022.

Long, D. *et al.* The emerging role of neutrophil extracellular traps in ulcerative colitis. **Frontiers in immunology**, v. 15, p. 1425251, 2024.

Lorenzi, H.; Matos, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas: Plantarium Nova Odessa**, SP: Instituto m, 2008.

Lu, W. I.; Lu, D. P. Impact of chinese herbal medicine on american society and health care system: perspective and concern. **Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM**, v. 2014, n. 1, p. 251891, 2014.

Manevski, M. *et al.* Increased expression of LAS1 lncRNA regulates the cigarette smoke and COPD associated airway inflammation and mucous cell hyperplasia. **Frontiers in immunology**, v. 13, p. 803362, 2022.

Matute-Bello, G. *et al.* Neutrophil apoptosis in the acute respiratory distress syndrome. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 156, n. 6, p. 1969-1977, 1997.

Matos, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. Fortaleza: Edições UFC, 1997.

Mattos, G. *et al.* Plantas medicinais e fitoterápicos na Atenção Primária em Saúde: percepção dos profissionais. **Ciência & saúde coletiva**, v. 23, n. 11, p. 3735–3744, 2018.

Mayadas, T. N.; Cullere, X.; Lowell, C. A. The multifaceted functions of neutrophils. **Annual review of pathology**, v. 9, n. 1, p. 181–218, 2014.

Md, P. M.; Md, T. K. Overview on Cucurbita maxima seed. **J Dent Med Sci**, v. 16, p. 29-33, 2017.

Menezes, L. G. *et al.* Lesão pulmonar aguda induzida pela administração endovenosa de extrato da fumaça do cigarro. **Jornal brasileiro de pneumologia: publicação oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia**, v. 39, n. 1, p. 39–47, 2013.

Min, J. E.; Huh, D.-A.; Moon, K. W. The joint effects of some beverages intake and smoking on chronic obstructive pulmonary disease in Korean adults: Data analysis of the Korea National Health and nutrition examination survey (KNHANES), 2008-2015. **International journal of environmental research and public health**, v. 17, n. 7, p. 2611, 2020.

Muhammed, H. E.; Noor Al-Mousawi, U. M.; Khamis, A. H. Investigation of DNA Protective, Anti-bacterial, and Antidiabetic Effects of Cucurbitacin E from Citrullus colocynthis L. Iraqi plant with invitro Toxicity Study. **Basrah Researches Sciences**, v. 51, n. 1, p. 15–15, 2025.

Oldenburger, A. *et al.* Anti-inflammatory role of the cAMP effectors Epac and PKA: Implications in chronic obstructive pulmonary disease. **PloS one**, v. 7, n. 2, p. e31574, 2012.

Onishi, K. Total management of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) as an independent risk factor for cardiovascular disease. **Journal of Cardiology**, v. 70, n. 2, p. 128–134, ago. 2017.

Papayannopoulos, V. *et al.* Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. **The journal of cell biology**, v. 191, n. 3, p. 677–691, 2010.

Paul, R. *et al.* Cucurbitacin: Unveiling its Role as Phytomolecule in Health Benefits. **Current bioactive compounds**, v. 21, n. 4, 2025.

Pedrosa, A. M.; Leal, L. K. A. M.; Lemes, R. P. G. Effects of hydroxyurea on cytotoxicity, inflammation and oxidative stress markers in neutrophils of patients with sickle cell anemia: dose-effect relationship. **Hematology, transfusion and cell therapy**, v. 43, n. 4, p. 468–475, 2021.

Peters, R. R.; Farias, M. R.; Ribeiro do Valle, R. M. Anti-inflammatory and analgesic effects of cucurbitacins from Wilbrandia ebracteata. **Planta medica**, v. 63, n. 6, p. 525–528, 1997.

Pletz, M. W. R. *et al.* Reduced spontaneous apoptosis in peripheral blood neutrophils during exacerbation of COPD. **European Respiratory Journal**, v. 23, n. 4, p. 532-537, 2004.

Rayner, B. S.; Love, D. T.; Hawkins, C. L. Comparative reactivity of myeloperoxidase-derived oxidants with mammalian cells. **Free radical biology & medicine**, v. 71, p. 240–255, 2014.

Reusch, N. *et al.* Neutrophils in COVID-19. **Frontiers in immunology**, v. 12, p. 652470, 2021.

Rezig, L. *et al.* Chemical composition and profile characterisation of pumpkin (*Cucurbita maxima*) seed oil. **Industrial crops and products**, v. 37, n. 1, p. 82–87, 2012.

Rosazza, T.; Warner, J.; Sollberger, G. NET formation – mechanisms and how they relate to other cell death pathways. **The FEBS journal**, v. 288, n. 11, p. 3334–3350, 2021.

Saini, N. *et al.* Exploring phenolic compounds as natural stress alleviators in plants- a comprehensive review. **Physiological and molecular plant pathology**, v. 133, n. 102383, p. 102383, 2024.

Salehi, B. *et al.* Cucurbita plants: From farm to industry. **Applied sciences** (Basel, Switzerland), v. 9, n. 16, p. 3387, 2019.

Salehi, Z. *et al.* The controversial effect of smoking and nicotine in SARS-CoV-2 infection. **Allergy, asthma, and clinical immunology: official journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology**, v. 19, n. 1, p. 49, 2023.

Schwartz, J.; Weiss, S. T. Cigarette smoking and peripheral blood leukocyte differentials. **Annals of epidemiology**, v. 4, n. 3, p. 236–242, 1994.

Semenkova, G. N. *et al.* 2-Hexadecenal regulates ROS production and induces apoptosis in polymorphonuclear leukocytes. **Cell biochemistry and biophysics**, v. 81, n. 1, p. 77–86, 2023.

Silva, M. C. C. *et al.* As repercussões do tabagismo no sistema cardiorrespiratório-uma revisão integrativa. **OBSERVATÓRIO DE LA ECONOMÍA LATINOAMERICANA**, v. 23, n. 3, p. e9310, 2025.

Silvestre, G. F. G.; De Lucena, R. P.; Da Silva Alves, H. Cucurbitacins and the immune system: Update in research on anti- inflammatory, antioxidant, and immunomodulatory mechanisms. **Current medicinal chemistry**, v. 29, n. 21, p. 3774–3789, 2022.

Stringer, K. A. *et al.* Cigarette smoke extract-induced suppression of caspase-3-like activity impairs human neutrophil phagocytosis. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 292, n. 6, p. L1572-L1579, 2007.

Tahir, M. N. *et al.* The biosynthesis of the cannabinoids. **Journal of cannabis research**, v. 3, n. 1, p. 7, 2021.

Tonello, S. *et al.* Extracellular traps in inflammation: Pathways and therapeutic targets. **Life** (Basel, Switzerland), v. 15, n. 4, 2025.

Trojan-Rodrigues, M. *et al.* Plants used as antidiabetics in popular medicine in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Journal of ethnopharmacology**, v. 139, n. 1, p. 155–163, 2012.

Vaguliene, N. *et al.* Local and systemic neutrophilic inflammation in patients with lung cancer and chronic obstructive pulmonary disease. **BMC immunology**, v. 14, n. 1, p. 36, 2013.

Vestbo, J. *et al.* Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 187, n. 4, p. 347–365, 2013.

Wahid, S.; Alqahtani, A.; Alam Khan, R. Analgesic and anti-inflammatory effects and safety profile of *Cucurbita maxima* and *Cucumis sativus* seeds. **Saudi journal of biological sciences**, v. 28, n. 8, p. 4334–4341, 2021.

Wang, L. *et al.* SUL-151 decreases airway neutrophilia as a prophylactic and therapeutic treatment in mice after cigarette smoke exposure. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 9, p. 4991, 2021.

Wang, S. *et al.* Exercise-induced oxygen desaturation increases arterial stiffness in patients with COPD during the 6WMT. **International journal of chronic obstructive pulmonary disease**, v. 19, p. 1479–1489, 2024.

Winterbourn, C. C.; Kettle, A. J.; Hampton, M. B. Reactive oxygen species and neutrophil function. **Annual review of biochemistry**, v. 85, n. 1, p. 765–792, 2016.

Wright, H. L. *et al.* Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. **Rheumatology** (Oxford, England), v. 49, n. 9, p. 1618–1631, 2010.

Yang, R. Y.; Lin, S.; Kuo, G. Content and distribution of flavonoids among 91 edible plant species. **Asia Pac. J. Clin. Nutr.**, v. 17, p. 275–279, 2008.

Yoshida, K. *et al.* Daily intake of a commercially available vegetable juice has beneficial effects on metabolic syndrome-related biomarkers in young, healthy Japanese adults. **Food and nutrition sciences**, v. 07, n. 10, p. 844–854, 2016.

Yuan, H. *et al.* The traditional medicine and modern medicine from natural products. **Molecules** (Basel, Switzerland), v. 21, n. 5, p. 559, 2016.

Zheng, X. *et al.* Cucurbitacin E elicits apoptosis in laryngeal squamous cell carcinoma by enhancing reactive oxygen species-regulated mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress. **American journal of cancer research**, v. 14, n. 8, p. 3905–3921, 2024.

Zhu, J.J.; Jiang, J.G. Pharmacological and nutritional effects of natural coumarins and their structure-activity relationships. **Molecular nutrition & food research**, v. 62, n. 14, p. e1701073, 2018.

