

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
Pró-Reitoria de Pesquisa e de Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação *stricto sensu*
Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos

LORENE SIMIONI YASSIN ANZUATEGUI

ANÁLISE *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO SUCO E EXTRATO DE
MAÇÃ EM CÉLULAS RINm5f SUBMETIDAS A DIFERENTES CONDIÇÕES DE
ESTRESSE OXIDATIVO

PONTA GROSSA
2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
Pró-Reitoria de Pesquisa e de Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação *stricto sensu*
Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos

LORENE SIMIONI YASSIN ANZUATEGUI

**ANÁLISE *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO SUCO E EXTRATO DE
MAÇÃ EM CÉLULAS RINm5f SUBMETIDAS A DIFERENTES CONDIÇÕES DE
ESTRESSE OXIDATIVO**

Dissertação apresentada como um dos requisitos à obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para o programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Dr. Alessandro Nogueira
Co-orientadora: Dra. Henriette Rosa de Oliveira
Emílio

PONTA GROSSA
2009

Ficha Catalográfica Elaborada pelo Setor de Processos Técnicos BICEN/UEPG

A673a Anzuategui, Lorene Simioni Yassin
Análise *in vitro* da atividade antioxidante do suco e extrato de maçã em células RINm5f submetidas a diferentes condições de estresse oxidativo. / Lorene Simioni Yassin Anzuategui. Ponta Grossa, 2009.
98 f.
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos.) - Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Orientador : Prof. Dr. Alessandro Nogueira
Co-orientador : Profa. Dra. Henriette Rosa de Oliveira Emilio

1. Potencial antioxidante. 2. Fenólicos. 3. Maçã. 4. Células secretoras de insulina. I. Nogueira, Alessandro. II. Emilio, Henriette Rosa de Oliveira. III. T.

CDD: 634.11


TERMO DE APROVAÇÃO

LORENE SIMIONI YASSIN ANZUATEGUI


**“ ANÁLISE IN VITRO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO SUCO E EXTRATO DE MAÇÃ
EM CÉLULAS RIN m5f SUBMETIDAS A DIFERENTES CONDIÇÕES DE ESTRESSE
OXIDATIVO “**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte Banca Examinadora:

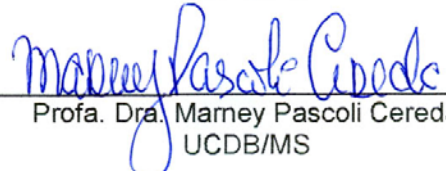
Ponta Grossa, 03 de Abril de 2009.



Prof. Dr. Alessandro Nogueira
UEPG



Profa. Dra. Carla Kanunfre
UEPG/PR



Profa. Dra. Marney Pascoli Cereda
UCDB/MS

Ponta Grossa
2009

DEDICATÓRIA

À Deus pela vida, força e missão
que a mim confiou.

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo incentivo e base educacional que me proporcionaram.

Ao meu orientador professor Dr. Alessandro Nogueira pela contribuição e incentivo na minha formação científica e pela oportunidade de desenvolver pesquisa.

À professora Dra. Henriette pela coorientação dessa dissertação, pela dedicação e conselhos.

À professora Dra. Carla C. Kanunfre e professor Dr. Gilvan Wosiacki pelo auxílio na escolha do tema da pesquisa entre outras orientações que enriqueceram a pesquisa.

À professora Dra. Maria Albertina de Miranda Soares pelo auxílio na interpretação das imagens de microscopia eletrônica de varredura.

À Danianni B. Marinho, devido ensinamentos e paciência nas milhares de vezes que precisei.

Aos colegas de turma Alessandra, Carmem, Catherine, Edenes, Luciana, Ricardo, Samantha, Thais e Tatiane pela companhia e ensinamentos de laboratório, química e engenharia de alimentos que me propuseram.

À técnica Denise Mendes pelo auxílio com os reagentes, materiais e equipamentos.

Ao Prof. Dr. Rui Curi do Instituto de Ciências Biomédicas da USP pelas células RINm5f que foram gentilmente doadas.

À aluna de iniciação científica Elise Felipe pelo apoio e auxílio nos experimentos com peróxido.

À técnica de laboratório Marlene dos Santos Rocha por dosar a secreção de insulina no Laboratório de Secreção de Insulina do Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.

Ao Departamento de Biologia Geral e de Engenharia de Alimentos da UEPG pelos laboratórios e fornecimento de equipamentos e materiais e departamento de Engenharia de Materiais da UEPG pela autorização das fotos em MEV.

De tudo ficaram três coisas:
A certeza de que estamos sempre começando...
A certeza de que é preciso continuar...
A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...

Portanto devemos:
Fazer da interrupção um caminho novo
Do medo uma escada
Do sonho uma ponte
Da procura...um encontro.

(Fernando Sabino)

RESUMO

Os compostos fenólicos, encontrados em vegetais e frutas, podem apresentar elevada atividade antioxidante. A maçã, segunda fruta de maior produção mundial, apresenta alto potencial antioxidante devido a seu teor e ao seu perfil de compostos fenólicos. O objetivo dessa pesquisa foi *analisar* a atividade antioxidante da maçã e estabelecer seu efeito sob células secretoras de insulina (RINm5F) submetidas ao estresse oxidativo induzido por elevada concentração de glucose (GA) e por H₂O₂. Nos extratos de fruta inteira, epicarpo e mesocarpo e sucos das cultivares Gala e Fuji, foram analisados açúcares redutores totais (AT), teor de fenóis totais (FT), atividade antioxidante (AA) antes e após centrifugação e filtração. Os ensaios biológicos compreenderam análises de citotoxicidade, viabilidade celular (VC) sob estresse oxidativo, produção intracelular de superóxido e análise da funcionalidade celular. Para avaliação da citotoxicidade foram testados diferentes diluições dos sucos de maçãs (1:10, 1:50, 1:100, 1:250) e quantidades de extratos (5, 10, 50 e 100 e 250 µg/mL). Para avaliar os efeitos biológicos foram utilizadas as diluições 1:50, 1:100 e 1:250 e as concentrações de extratos do epicarpo 10, 50 e 100 µg/mL para maçã Gala e 10 µg/mL para maçã Fuji. Na fruta inteira e mesocarpo os teores de AT variaram de 9,88 a 12,10 g/100g e no epicarpo foram na ordem de 3 vezes menos. Suco de maçã Gala e Fuji foi encontrado, respectivamente, 12,94 e 10,33 g/100g de AT. Grande perda de FT e da AA foi observada após centrifugação e em especial após filtração. Maior quantidade de FT foi observada no extrato de epicarpo de maçã Fuji antes da filtração. Após filtração o maior conteúdo de FT estava nos extratos de maçã Gala. Mesmo apresentando menos FT em relação à maçã Gala após a filtração, o extrato de epicarpo de maçã Fuji manteve maior AA. O suco de maçã Gala, em relação ao suco da maçã Fuji apresentou mais FT e AA antes e após a filtração. No ensaio de citotoxicidade, apenas o extrato do epicarpo de maçã Fuji em concentrações acima de 10 µg/mL foi citotóxico. Sob estresse induzido por GA, o extrato de epicarpo de maçã Gala (10 µg/mL), todas as diluições testadas do suco de maçã Gala, assim como o suco da maçã Fuji (1:250), aumentaram a VC. O suco de maçã Fuji apresentou efeito citotóxico na diluição 1:50. Extrato de epicarpo de maçã Gala (10, 50 e 100 µg/mL), assim como o suco da maçã Fuji (1:250), reduziram a produção intracelular de superóxido. Na presença de estresse induzido por H₂O₂, o suco de maçã Gala e Fuji (1:50 e 1:100) apresentaram efeito citoprotetor, aumentando a VC quando comparados ao grupo H₂O₂. Entretanto, quando analisada a morfologia celular, nenhum dos sucos testados foi capaz de reverter significativamente os danos causados pelo H₂O₂. Aumento significativo de 50% em média na secreção de insulina foi observado no suco de maçã Gala (1:100 e 1:250) e suco de maçã Fuji (1:50). Foi possível concluir que de acordo com tipo de estresse oxidativo e das concentrações utilizadas, extrato de epicarpo e suco das maçãs Gala e Fuji, podem diminuir o estresse oxidativo e melhorar a funcionalidade de células RINm5f.

Palavras-chave: potencial antioxidante, fenólicos, maçã, células secretoras de insulina.

ABSTRACT

The phenolic compounds, found in vegetables and fruits, may have a high antioxidant activity. Apple, world's second largest produced fruit, is classified as having one of the high antioxidant potential due to its content and profile of phenolic compounds. The aim of this research was to evaluate the antioxidant activity of apple and check its effect on cells secreting insulin (RINm5f) subjected to oxidative stress induced by high concentration of glucose (GA) and H₂O₂. Once prepared juices and extracts of whole fruit, flesh and epicarp of Gala and Fuji cultivars, the following parameters were analyzed: total non-reducing sugars (AT), total phenols content (FT), antioxidant activity (AA) before and after centrifugation and filtration. Cytotoxicity, cell viability (VC) on oxidative stress and production of intracellular superoxide analysis were performed in biological tests. Several dilutions (1:10, 1:50, 1:100, 1:250) and quantities of extracts (5, 10, 50, 100 and 250 mg/mL) of apple juice were tested to evaluate cytotoxicity. To evaluate biological effects, juice dilutions of 1:50, 1:100 and 1:250 were used for Gala and Fuji apple. Epicarp extracts concentration of 10, 50 and 100 mg/mL were used for Gala apple and 10 mg/mL for Fuji apple. In the whole fruit and fruit flesh, AT content ranged from 41.69 to 50.80 g/100g and epicarp's was about 10 times less. Gala and Fuji juice AT content was, respectively, 12.94 g and 10.33 g/100g. Big loss of FT and the AA was observed after centrifugation and especially after filtration. Highest amount of FT was found in epicarp extract of Fuji apple before filtration. After filtration the highest concentration of FT was in extracts of Gala apple. Even presenting less FT than Gala apple after filtering, the epicarp extract of Fuji apple kept higher AA. Gala apple juice presented more FT and AA before and after filtration than Fuji apple juice. During cytotoxicity test, only Fuji apple epicarp extract at concentrations above 10 g/mL was cytotoxic. Under GA induced stress, Gala apple epicarp extract (10 mg/mL), all tested dilutions of Gala apple juice and the Fuji apple juice (1:250), increased the VC. Fuji apple juice showed cytotoxic effect on dilution 1:10. Gala apple epicarp extract (10, 50 and 100 g/mL) Fuji apple juice (1:250), reduced production of intracellular superoxide. Gala and Fuji apple juice (1:50 and 1:100) had cytoprotectant effect under H₂O₂ induced stress, increasing VC when compared to H₂O₂ group. However, none of the juices tested was able to significantly reverse the damage caused by H₂O₂ when cell morphology was evaluated. Significant increase of 50% on average in the secretion of insulin was observed in Gala apple juice (1:100 and 1:250) and Fuji apple juice (1:50). It could be concluded that according to oxidative stress type and extract of epicarp and juice of Gala and Fuji apples concentration, oxidative stress on cells RINm5f may be reduced.

Keywords: antioxidant potential, phenolic compound, apple, insulin secreting cells

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

QUADRO 1 - Principais antioxidantes presentes na casca e polpa da maçã	23
FIGURA 1 - Principais classes e compostos fenólicos encontrados em frutas, modificado de Rice-Evans (2003).....	25
QUADRO 2 - Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio de interesse biológico.....	30
FIGURA 2 - Curva de crescimento das células RINm5f secretoras de insulina.....	60
FIGURA 3 - Viabilidade das células RINm5f.....	61
FIGURA 4 - Viabilidade das células RINm5f em diferentes concentrações do extrato e diluições do suco clarificado de maçã e na ausência de estresse oxidativo...	66
FIGURA 5 - Viabilidade das células RINm5f em diferentes concentrações do extrato e diluições do suco clarificado de maçã Fuji e Gala quando submetidas à alta concentração de glucose.....	69
FIGURA 6 - Efeito do extrato e suco de maçã Fuji e Gala na produção intracelular de superóxido.....	72
FIGURA 7 - Efeito do extrato de epicarpo e suco de maçã Gala e Fuji na viabilidade celular quando submetido ao H ₂ O ₂	75
FIGURA 8 - Aspecto morfológico das células RINm5f antes do tratamento (A) após tratamento com 100µM de peróxido de hidrogênio (B), efeito do tratamento e presença de suco da maçã Fuji na diluição de 1:50 (C) e efeito do tratamento e presença de suco de maçã Gala na diluição de 1:50 (D).....	77
FIGURA 9 - Efeito do extrato do epicarpo e suco das maçãs Gala e Fuji na secreção de insulina.....	79

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	Composição físico-química da cultivar Red delicious.....	22
TABELA 2 -	Açúcares totais (g/100g) nos extratos da fruta e suas partes e dos sucos clarificados das cultivares Fuji e Gala.....	53
TABELA 3 -	Efeito dos processos de filtração e centrifugação no teor de compostos fenólicos ($\mu\text{g/mL}$) nos extratos da maçã inteira, do epicarpo e do mesocarpo.....	54
TABELA 4 -	Concentração de fenóis em mg/mL de extrato e suco de maçã utilizados nos experimentos.....	55
TABELA 5 -	Efeito dos processos de filtração e centrifugação na atividade antioxidante (mmol/g) de extratos da maçã inteira, do epicarpo e do mesocarpo.....	55
TABELA 6 -	Efeito do processo de filtração nos teores de compostos fenólicos ($\mu\text{g/mL}$) e da atividade antioxidante ($\mu\text{mol/g}$) de sucos varietais de maçãs.....	58
TABELA 7 -	Resumo dos resultados da pesquisa.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Absorbância
AGEs	Produtos finais da glicação avançada (<i>advanced glycation end products</i>)
ANOVA	Análise de variância
CDK	Enzima quinase dependente de ciclina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EPM	Erro padrão da média
FRAP	<i>Ferric reducing ability of plasma</i>
GA EX	Solução extratora na presença de glucose em alta concentração
GSH	Glutathiona reduzida
HBA	Ácido hidroxibenzoico
HCA	Ácido hidroxicinâmico
HBP	Rota das hexosaminas (<i>hexosamine pathway</i>)
HCl	Ácido Clorídrico
HNE	4-hidroxi-2-nonenal
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
KOH 2M	Hidróxido de potássio 2 Molar
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MDA	Malondialdeído
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
ORAC	<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PM 6000	Polietilenoglicol 6000
ppm	Partes por milhão
PPO	Enzima polifenol oxidase
RNA	Ácido ribonucléico
ROO•	Radical alquil peroxil
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
TAC	Capacidade antioxidante total
TBAR	Ácido tiobarbitúrico
TPTZ	2,4,6-tripiridil-s-triazine
TROLOX	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-carboxílico
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>
VCEAC	Equivalentes de capacidade antioxidante da vitamina C
W ₈ O ₂₃	Óxido de wolframio
8-OhdG	8-hidroxi-2'-desoxiguanosina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	A MAÇÃ	17
2.1.1	A produção nacional	19
2.1.2	A composição das frutas	19
2.2	OS COMPOSTOS FENÓLICOS	23
2.2.1	A função fisiológica na fruta	23
2.2.2	A síntese de fenóis	23
2.2.3	As diferentes classes	24
2.2.4	A localização na fruta	26
2.2.5	Capacidade antioxidante dos fenóis da maçã	26
2.3	A IMPORTÂNCIA NUTRICIONAL DOS COMPOSTOS FENÓLICOS	28
2.3.1	Os compostos antioxidantes	28
2.3.2	Os radicais livres e a função antioxidante	28
2.4	AÇÃO DOS FENÓIS DA MAÇÃ SOBRE OS RADICAIS LIVRES	31
2.4.1	Atividade antioxidante de diferentes classes de fenóis	31
2.4.2	Efeitos comprovados de fenóis da maçã	34
2.5	EXPERIMENTOS IN VITRO COM POLIFENÓIS	36
2.6	HIPERGLICEMIA E ESTRESSE OXIDATIVO	37
2.7	CONSEQÜÊNCIAS DO ESTRESSE OXIDATIVO EM CÉLULAS SECRETORAS DE INSULINA	38
2.8	MODELOS E MARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO	39
3	OBJETIVOS	43
3.1	OBJETIVO GERAL	43
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
4	MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1	PROCESSOS	44
4.1.1	Obtenção do extrato de maçã	44
4.1.2	O processamento do suco	45
4.1.3	Meio de cultivo das células secretoras de insulina	45
4.2	ANÁLISES	45
4.2.1	Determinação de açúcares redutores totais	45
4.2.2	Determinação de compostos fenólicos totais	45
4.2.3	Determinação da atividade antioxidante	46
4.2.4	Curva de crescimento das células secretoras de insulina	47
4.3	EXPERIMENTOS	47
4.3.1	Avaliação da citotoxicidade do extrato de maçã pelo método de redução do MTT	47
4.3.2	Indução do estresse oxidativo	49
4.3.3	Avaliação dos sucos e do epicarpo de maçã na produção de ânions superóxidos	49
4.3.4	Análise da funcionalidade celular: secreção de insulina	50
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1	DOSAGEM DE AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS	52
5.2	EFEITO DOS PROCESSOS NO TEOR DE FENÓLICOS E NA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	54
5.3	ANÁLISES BIOLÓGICAS	59
5.3.1	Caracterização da curva de crescimento das células RINm5f	59

5.3.2	Tempo de dobramento das células RINm5f.....	59
5.3.3	Viabilidade das células RINm5f.....	60
5.3.4	Produção intracelular de superóxido induzido com alta concentração de glucose.....	70
5.3.5	Viabilidade celular na presença de estresse induzido por peróxido de hidrogênio.....	72
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	80
7	CONCLUSÕES	82
	REFERÊNCIAS	83

1 INTRODUÇÃO

A relação entre compostos fenólicos presentes em alimentos e a sua capacidade antioxidante tem sido objetivo de diversas investigações. O consumo de alimentos contendo esses compostos é associado, com base na literatura internacional, a baixa incidência de doenças crônicas como câncer e diabetes (SAIJA et al., 1995). Essas doenças são relacionadas à escolha do estilo de vida das quais um dos fatores de maior importância é a composição da dieta alimentar.

A maçã brasileira, por ser uma fruta de sabor diferenciado daquela importada, mudou os hábitos do consumidor, resultando no aumento do consumo, que se situa em 4,6 kg *per capita* ao ano. O consumo ainda é baixo comparado ao da Áustria (32,8 kg), Turquia (71,7 kg) e Bélgica (28,7 kg). Os países do Mercosul apresentam consumo mais elevado onde a Argentina consome 11,1 kg e o Chile 6,5 kg *per capita* (MELLO, 2007).

Na população norte-americana, foi estimado que o consumo de maçã seja responsável por 25% da ingestão *per capita* de polifenóis em frutas (VINSON et al., 2001). Em se considerando que teor de fenóis das maçãs brasileiras correspondem à 1000 mg/kg, estima-se que o consumo anual seja de 4,6 g de polifenóis provenientes desta fruta.

Face à elevada atividade antioxidante das maçãs, pesquisadores (LEE; SMITH, 2000) sugerem que as pessoas devam consumir mais esta fruta ou pelo menos uma por dia a fim de aumentar o conteúdo antioxidante total de sua dieta e evitar estados patológicos. Song et al. (2005) encontraram redução de 28 % no risco de desenvolver diabetes em mulheres que consumiam ao menos uma maçã ao dia quando comparadas àquelas que não consumiam maçãs. Entretanto, quando os compostos fenólicos da maçã são aplicados isoladamente e em altas concentrações podem apresentar atividade citotóxica (ESTEVES et al., 2008), tornando-se essencial pesquisas sobre a ingestão da quantidade correta.

A maçã apresenta significativo teor de compostos fenólicos, que pode variar em função da cultivar, da região de cultivo, do clima e de práticas culturais, de 1000 a 6000 mg/kg (SHAHIDI; NACZK, 2004), com potencial uso preventivo da fruta no controle de doenças como câncer, diabetes e afecções cardiovasculares (BOYER; LIU, 2004).

A fisiopatologia de doenças crônicas degenerativas como diabetes, cânceres e doenças cardiovasculares estão relacionadas, entre outros fatores, ao balanço redox. Quando radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) são produzidos *in vivo* em níveis que não podem ser combatidos pelo sistema antioxidante endógeno, podem ocorrer danos em lipídios, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos. Esse desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e a capacidade antioxidante do organismo é denominada estresse oxidativo. Modificações oxidativas em biomoléculas causadas por níveis tóxicos de ROS e RNS representam danos que podem levar à conseqüências deletérias como uma diminuição das funções das células (MORAN; GUTTERIDGE; QUILAN, 2001).

As células do pâncreas têm alta susceptibilidade ao ataque por radicais livres (LENZEN et al., 1996) sendo um dos fatores envolvidos no desenvolvimento de doenças do pâncreas como o diabetes *mellitus* (ZHANG; OLLINGER; BRUNK, 1995). A exposição crônica das células B pancreáticas à alta concentração de glucose é acompanhada da redução na secreção e na expressão gênica da insulina (POITOUT; ROBERTSON, 2002) e redução da massa de células B por indução da morte celular (apoptose) (DONATH et al., 1999; PICK et al., 1998).

Em condições de hiperglicemia, a glucose é preferencialmente utilizada na via dos polióis (LEE; CHUNG, 1999), o que leva ao consumo de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), necessários para a regeneração da enzima glutatona redutase. Portanto, hiperglicemia causa a depleção de glutatona (GSH) que leva ao aumento do estresse oxidativo (PASAOGLU; SANCAK; BUKAN, 2004). Soma-se a esse fator a ocorrência do estresse oxidativo gerado pelo aumento da O-glicosilação nessas células (D'ALESSANDRIS et al., 2004; ANDREOZZI et al.,

2004). A hiperglicemia crônica afeta negativamente a função dos receptores de insulina assim como a funcionalidade e a expressão deste hormônio em células RINm5f (HRIBAL et al., 2003).

Outro fator para o aumento da produção de radicais livres e conseqüentemente, do estresse oxidativo é a presença de peróxido de hidrogênio em altos níveis. Em células de linhagem RINm5f a peroxidação induzida aumenta o influxo de íons cálcio na célula resultando em apoptose (ISHII et al., 2006). Pesquisas que utilizam esses modelos de estresse podem contribuir para a prevenção e tratamento destas complicações.

Os compostos antioxidantes, captadores de espécies reativas de oxigênio, auxiliam na prevenção das doenças que podem ser causadas pelo estresse oxidativo. Polifenóis metabolizados pelas plantas têm demonstrado elevada atividade antioxidante em numerosos sistemas (CROFT, 1998; FORMICA; REGELSON, 1995) pela sua propriedade citoprotetora (ISHIGE; SCHUBERT; SAGARA, 2001; NARDINI et al., 1998; NEGRE-SALVAYRE, 1992). Há pesquisas sobre os efeitos benéficos das frutas, e a maçã apresenta um grande potencial (CURTI; SALGADO, 2005) para trabalhos *in vitro* e *in vivo*.

A partir do conhecimento destas variáveis, foi avaliado *in vitro* a capacidade antioxidante de extrato e do suco de maçã em células secretoras de insulina submetidas ao estresse oxidativo induzido por alta concentração de glucose e peróxido de hidrogênio.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Alimentos funcionais

ROBERFROID (2000) define alimentos funcionais, de maneira prática, como sendo: alimentos naturais, alimentos com adição de componentes, alimentos com redução de componentes, alimento com modificação de um ou mais componentes, alimentos com

modificação da biodisponibilidade de um ou mais componentes, quaisquer combinações destas possibilidades.

O Codex Alimentarius (1999), definiu dois tipos de alegações, de maior relevância: alegação de melhora da função (tipo A) ou alegação de redução no risco de doença (tipo B). A alegação de melhora da função (tipo A) refere-se a(s) consequência(s) positiva(s) de interações entre os componentes dos alimentos e funções no organismo sem referência direta à redução no risco de qualquer enfermidade. Exemplos incluem a prevenção do estresse oxidativo (antioxidantes). A alegação de redução no risco de doença (tipo B) refere-se a redução no risco de doença pelo consumo de componentes alimentares específicos ou misturas. Exemplos de tais alegações é a redução do risco de doença cardiovascular ou câncer (ROBERFROID, 1999).

O Brasil apresenta uma legislação bastante avançada sobre os alimentos funcionais. As Portarias da Vigilância Sanitária nº 18 e 19, de 1999, apresentam questões que ajudam a sustentar ou não as alegações de propriedades funcionais dos alimentos e quais os critérios para a demonstração das mesmas. Dessa forma, torna-se indispensável que o profissional da área da saúde conheça profundamente os alimentos funcionais, suas funções, quantidade recomendada de ingestão e a biodisponibilidade de seus fitoquímicos, para a adequada incorporação desses à sua prática de prescrição dietética (PASCHOAL, 2001).

Mais significativo, talvez, é o potencial dos alimentos funcionais de mitigar doenças, promover a saúde e reduzir os custos da assistência à saúde (HASLER, 1998). Em 1992, uma revisão de 200 estudos epidemiológicos (BLOCK et al., 1992) mostrou que o risco de câncer em pessoas que consumiam dietas ricas em frutas e vegetais foi 50% maior naquelas que consumiam pouco destes alimentos. Está claro agora que há componentes em uma dieta baseada em plantas que são diferentes dos nutrientes tradicionais e que podem reduzir o risco de câncer. Steinmetz e Potter (1991) identificaram mais de uma dezena de classes dessas substâncias químicas de origem vegetal e que são ativas biologicamente, agora conhecidas como "fitoquímicos".

2.2 A maçã

2.2.1 A produção nacional

A produção brasileira da maçã obteve um significativo crescimento ao longo dos últimos 32 anos com a implantação dos pomares comerciais nas regiões elevadas dos estados sulinos, compreendendo o sul do Paraná, a Região Serrana e o meio oeste do Estado de Santa Catarina e a Serra Gaúcha no norte do Estado do Rio Grande do Sul. Na safra 1973/74, a produção foi de 1.528 toneladas, aumentando para 960.000 toneladas na safra de 2005/06. Atualmente a cultura da maçã pode ser considerada uma atividade econômica relevante na Região Sul do país, com repercussão no cenário internacional, contribuindo com aproximadamente 1,5 % da produção mundial (ABPM, 2006; PAGANINI et al., 2004).

A maior parte da produção provém de três cultivares: Gala, Fuji e Golden delicious. A cultivar Gala é a primeira a ser colhida, em fevereiro, representando 48 % da produção total a Fuji, cuja colheita se dá em abril, é a mais resistente para frigoconservação, participando com 42 % da produção e a Golden delicious, colhida em março, representa 3 % da produção total, sendo os 7 % restantes compostos por outras cultivares (ABPM, 2006; MELLO, 2004).

2.2.2 A composição das frutas

Os açúcares

Segundo Wosiacki, Pholman e Nogueira (2004), os açúcares redutores totais e sua distribuição sob a forma de sacarose, glucose e frutose são importantes dentre os atributos de qualidade por diferentes motivos. Para efeitos de consumo *in natura* a mistura conhecida tecnicamente como açúcar invertido proporciona à fruta o característico sabor doce de uma forma mais peculiar do que os componentes propriamente ditos. Para efeitos industriais quanto mais açúcar presente, melhor para o processo de fermentação ou para o de obtenção de sucos

concentrados clarificados. A discriminação das cultivares pelos teores de açúcares glucose e frutose está sendo proposta como um instrumento a mais na classificação de maçãs. Os mesmos autores avaliaram 15 cultivares de maçã com interesse industrial e citam nesse trabalho que a cultivar Sansa é altamente promissora para uso em alimentos com apelo funcional, pois apresenta cerca de 12 % de frutose total, o que corresponde a 84% dos açúcares redutores totais da fruta. Como interessante do ponto de vista industrial, por apresentarem valores do indicador próximo ao limite 20 (açúcar/acidez) são a Belgolden, as Coop 25 e 26, a Melrose e a Malus 67/90. A Sansa desponta como a portadora de maiores teores de frutose e potencialmente como matéria-prima para a elaboração de bebidas com apelo funcional. O percentual elevado de frutose é um bom indicador nutricional, pois esse monossacarídeo é mais doce e, pela particularidade de ser absorvido no trato intestinal e metabolizado nas células do epitélio, é considerado dietético (LEHNINGER et al., 1995).

Os ácidos orgânicos

As maçãs apresentam o ácido málico como predominante por determinação gênica e os demais ácidos orgânicos não chegam a atingir o valor correspondente a 5% do total, razão pela qual são usualmente negligenciados (CZELUSNIAK et al., 2003). Os autores anteriormente citados, avaliaram 27 variedades de maçãs com relação aos teores de açúcares expressos como glucose em g/100mL, à acidez total titulável expressa como ácido málico em g/100mL aos compostos fenólicos expressos como catequina em mg/L (ppm) e às razões frutose/glucose e açúcares totais/acidez. As análises resultaram em uma amplitude que vai de 144 a 685 ppm para compostos fenólicos, com um teor médio de 353 ± 152 mg/kg, o que indica um coeficiente de variação superior a 40 %, ou seja, há bastante heterogeneidade com relação a este parâmetro. Wosiacki e Nogueira (2005) determinaram a composição físico-química de 124 cultivares de maçãs brasileiras produzidas em 19 safras entre o período de 1982 a 2003, e indicam que a

acidez média é de 0,376 g/100mL, porém com amplitude de 0,086 a 1,118 g/100mL, com coeficiente de variação de 46,21 %.

As fibras

Os teores de fibras totais na maçã variam discretamente de 1,97 g/100g a 2,2 g/100g. Pesquisas que analisaram o epicarpo (casca) e o mesocarpo (polpa) de maçã (LEONTOWICZ, GORINNSTEIN; LEONTOWICZ, 2003) encontraram no epicarpo 2,6 a 3,3 g/100g de fibra total (PHILIPPI, 2001) e no mesocarpo 1,1 a 1,6 g/100g de fibra total (GUIUNTINI et al., 2003), ambos na base fresca. Gheyas et al. (1999) analisaram o conteúdo de fibras em treze variedades de maçã (Cortland, Empire, Fuji, Golden Delicious, Gala, Granny Smith, Jonagold, Mutsu, McIntosh, Delicious, Rome, Stayman e York) e o conteúdo de parede celular que não era amido foi de $23,1 \pm 4,5$ g/kg. Os autores concluem ainda que a quantidade de fibras pode variar de 19,1 g/kg na maçã Fuji a 36,2 g/kg no cultivar York.

As vitaminas e os minerais

A cultivar Red delicious é uma das cultivares de maçãs mais difundidas no mercado consumidor americano e Johnson et al. (1984) divulgaram a sua composição em termos de vitaminas hidrossolúveis e de íons uma vez que a análise centesimal aproximada estava dentro do esperado, de acordo com os padrões americanos, explicitados no Handbook 8 de responsabilidade do Orgão estatal USDA. Os autores tomaram amostras em seis cidades e tiveram o cuidado de selecioná-las em épocas de alta e baixa disponibilidade no mercado da Costa Leste à Oeste, e os resultados podem ser observados na Tabela 1.

TABELA 1 - Composição físico-química da cultivar Red delicious.

Micronutriente (mg/100g)	Red delicious		Handbook 8 Referencial
	Valores médios	Amplitude	
Acido ascórbico	5,51	1,69 – 6,12	5,7
Niacina	0,08	0,05 - 0,10	0,08
Ácido pantotênico total	0,07	0,05 - 0,10	0,06
Acido pantotênico livre	0,06	0,05 - 0,09	-
Vitamina B6	0,03	0,02 - 0,04	0,05
Riboflavina	0,02	0,01 - 0,02	0,01
Tiamina	0,01	0,005 - 0,016	0,02
Acido fólico total	0,85	0,60 - 1,06	2,80
Ácido fólico livre	0,21	0,21 - 0,30	-

Fonte: Johnson et al. (1984).

Nos cultivares Gala e Fuji, os minerais potássio (K), fósforo (P), magnésio (Mg) e cálcio (Ca) encontrados na maçã representaram mais de 50 % do teor de cinza total. O teor de potássio nas frutas é superior aos demais minerais, 7300 e 7500 mg/L para Gala e Fuji, respectivamente. Os teores de fósforo são diferentes entre as cultivares Gala (487 mg/L) e Fuji (150 mg/L). O magnésio apresenta valores superiores na Fuji (411 mg/L) quando comparado à cultivar Gala (354 mg/L). A maioria dos minerais é transportada via xilema durante a transpiração da fruta, quando a fruta inicia o estágio de amadurecimento. Ocorre diminuição da transpiração devido à modificação da película e degenerescência dos estômatos, cessando o acúmulo de Ca e, em menor intensidade, o de Mg. Além disso, durante a maturação a concentração destes dois minerais diminui (NOGUEIRA et al., 2007).

Os fitonutrientes

Maçãs contêm significativas quantidades de compostos fitoquímicos. A epiderme, particularmente, é uma rica fonte de quercetina a qual é reconhecidamente um composto com elevada atividade antioxidante. Diferentes cultivares de maçã demonstram quantidades particulares de atividade antioxidante e de fitoquímicos. Boyer e Liu (2004) determinaram os antioxidantes presentes na casca e polpa da maçã (Quadro 1).

Partes da maçã	Compostos fenólicos
Casca	Cianidina-3-galactosídeo Quercetina-3- galactosídeo Quercetina-3-glucosídeo Quercetina-3-raminosídeo Ácido clorogênico Ácido cumárico Ácido gálico
Casca e Polpa	Catequina Epicatequina Procianidina Floridzina

QUADRO 1 - Principais antioxidantes presentes na casca e polpa da maçã.
Fonte: Boyer e Liu (2004).

Face à elevada atividade antioxidante das maçãs, os autores LEE; SMITH (2000) sugerem que as pessoas devem consumir, mais ou pelo menos, uma por dia a fim de aumentar o conteúdo antioxidante total de sua dieta.

2.3 Os compostos fenólicos

2.3.1 A função fisiológica na fruta

Fenólicos fazem parte do mecanismo de defesa na maçã contra fungos patógenos como *Venturia* sp., *Gloeosporium* sp., *Sclerotinia fructigena*, e *Botrytis cinerea*. Caso o tecido da fruta seja infectado, ocorre aumento na atividade da enzima polifenol oxidase (PPO) levando à aceleração da oxidação de polifenóis. Os produtos da oxidação dos polifenóis desempenham importante função na resistência do tecido da fruta à patógenos (SHAHIDI; NACZK, 2004).

2.3.2 A síntese de fenóis

Os compostos fenólicos presentes em alimentos originam-se de uma das muitas classes de metabólitos secundários de plantas (FEREIDOON, 2002; VAN SUMERE, 1989).

As duas principais classes de compostos fenólicos da maçã compreendem os ácidos fenólicos e os flavonóides. Nessas classes, podem ser encontrados cinco principais grupos de compostos fenólicos sendo os ácidos hidroxicinâmicos e hidroxibenzóicos os representantes dos ácidos fenólicos e, os flavan-3-óis (catequina, epicatequina e proantocianidóis), antocianinas, flavonóides (quercetina) e dihidrochalconas (floreína e floreína) representantes dos flavonóides (GUYOT et al., 1997).

2.3.3 As diferentes classes

Ribéreau-Gayon (1968) adotou a seguinte classificação para compostos fenólicos: pouco distribuídos na natureza, polímeros e largamente distribuídos na natureza.

Na família dos compostos fenólicos pouco distribuídos na natureza estão os fenóis simples, o pirocatecol, a hidroquinona e o resorcinol. A esta família pertencem os aldeídos derivados dos ácidos benzóicos, que são constituintes dos óleos essenciais como da vanilina.

Alguns compostos fenólicos não se apresentam em forma livre nos tecidos vegetais. São aqueles presentes sob a forma de polímeros, como os taninos e as ligninas. Os taninos, são compostos de alto peso molecular, que conferem ao alimento a sensação de adstringência. Classificam-se em dois grupos baseados em seu tipo estrutural: taninos hidrolisáveis e taninos condensados (Figura 1). Os primeiros contêm um núcleo central de glucose ou um álcool poliídrico, esterificado com ácido gálico ou elágico, e são prontamente hidrolisáveis com ácidos, bases ou enzimas. Os taninos condensados, polímeros de catequina e/ou leucoantocianidina, não prontamente hidrolisáveis por tratamento ácido. As ligninas são polímeros complexos de grande rigidez e resistência mecânica e sua hidrólise alcalina libera uma variedade de derivados dos ácidos benzóico e cinâmico.

Na família dos compostos largamente distribuídos na natureza estão os fenólicos encontrados geralmente em todo o reino vegetal, mas às vezes localizados em uma só planta. Estes fenólicos estão divididos em dois grandes grupos: os flavonóides e os ácidos fenólicos

(ácidos benzóico, cinâmico e seus derivados). Os flavonóides tem estrutura básica formada por C6-C3-C6, sendo os compostos mais diversificados no Reino Vegetal. Neste grupo encontram-se as antocianidinas, flavonas, flavonóis e, com menor frequência, as auronas, calconas e isoflavonas, dependendo do lugar, número e combinação dos grupamentos participantes da molécula.

Os ácidos fenólicos são divididos em três grupos. O primeiro é composto pelos ácidos benzóicos, que possuem sete átomos de carbono (C6-C1) e são os mais encontrados na natureza. O segundo é formado pelos ácidos cinâmicos, que possuem nove átomos de carbono (C6-C3), sendo sete os comumente encontrados no Reino Vegetal. As cumarinas, terceiro grupo, são derivadas do ácido cinâmico por ciclização da cadeia lateral do ácido *o*-cumárico. Os ácidos fenólicos, além de se apresentarem sob sua forma natural, podem se ligar entre si ou com outros compostos. A combinação mais importante destes ácidos ocorre com o ácido caféico, o qual, associado a um álcool-ácido cíclico, denominado ácido quínico, origina o ácido clorogênico.

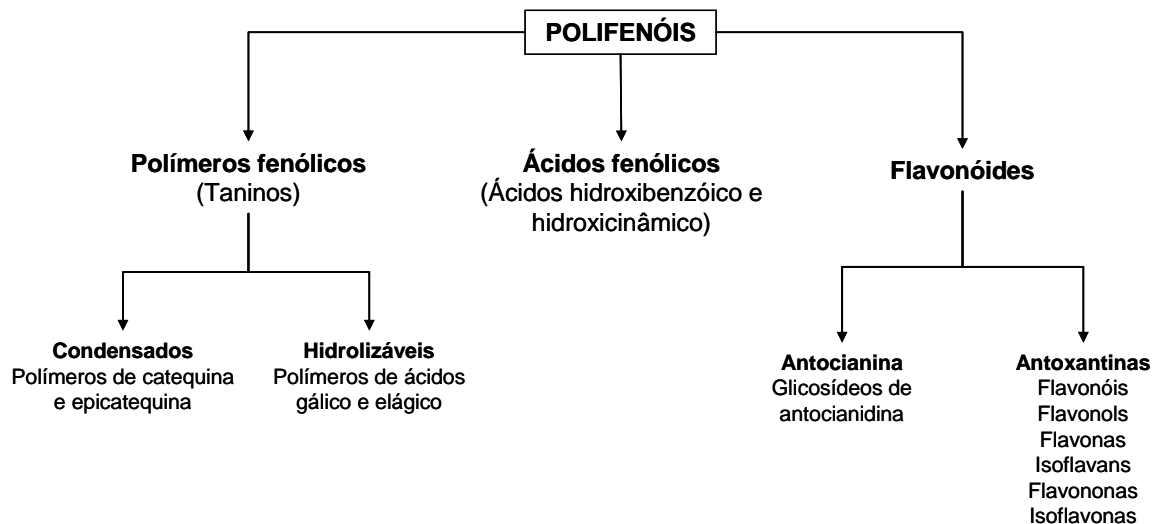


Figura 1. Principais classes e compostos fenólicos encontrados em frutas, modificado de Rice-Evans (2003).

2.3.4 A localização na fruta

A concentração dos fitoquímicos da maçã depende de diversos fatores, como o cultivar, clima, região, solo, armazenamento e processamento da fruta. Além disso, o teor de fitoquímicos pode variar em função da parte da fruta, sendo o epicarpo a porção com mais compostos fenólicos em comparação ao mesocarpo e ao endocarpo (BOYER; LIU, 2004; NOGUEIRA et al., 2003). Em diferentes cultivares a relação casca/polpa de concentração de fenóis, pode variar de 3 a 10 vezes (NICOLAS et al., 1994).

O conteúdo total de polifenóis na epiderme, parênquima, casca e sementes da maçã corresponde a aproximadamente 5000 mg/kg (GOLDIN et al., 2001), mas a maior quantidade de fenólicos encontrados na maçã inteira localizam-se no parênquima (64%) (GUYOT et al., 1998).

Em maçãs, os compostos fenólicos estão localizados nos vacúolos (97 %), sendo que nas células da epiderme e sub-epiderme as suas concentrações representam quantidades superiores àquelas encontradas nos tecidos internos da fruta e essa relação epiderme/mesoderme de concentração de fenóis pode ser 3 a 10 vezes superior (NICOLAS et al., 1994).

2.3.5 Capacidade antioxidante dos fenóis da maçã

Wang, Cao e Prior (1996) analisando a capacidade antioxidante total de frutas, pelo método ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*), verificaram que a maçã pode ser considerada como uma fruta de alto poder antioxidante, entre outras, como o morango, ameixa, uva rosada, laranja, kiwi, *grapefruit*, uva branca, banana, tomate, pêra e melão.

Chinnici et al. (2004) verificaram e quantificaram a capacidade antioxidante total dos fenólicos (TAC) que foi expresso por equivalente de Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-carboxílico (TROLOX) em diferentes partes da maçã Golden delicious na forma de extrato aquoso. No epicarpo de cultivo não orgânico foi observado maior TAC seguido do epicarpo de maçã orgânica, mesocarpo integral e mesocarpo de maçãs produzidas pelo sistema orgânico. Nos

epicarpos, os maiores contribuintes para a atividade antioxidante foram os flavonóis e procianidinas, os quais contribuíram com 90 % da atividade antioxidante total. Enquanto que, na polpa, a TAC foi atribuída aos flavonóis em conjunto com os hidroxicinâmicos.

Os efeitos benéficos provenientes do consumo da maçã são alvo de pesquisas em todo o mundo e freqüentemente atribuídos aos componentes presentes na fruta, como as fibras, vitamina C e os fenólicos. Esses compostos agem em conjunto, exercendo ações positivas para aqueles que consomem a fruta regularmente e seguem um estilo de vida saudável (CURTI; SALGADO, 2005).

Boyer e Liu (2004) observaram que o consumo de maçã, comparado com outras frutas, foi associado com a redução do risco de desenvolver câncer, doenças cardíacas, doenças pulmonares, diabetes tipo II, além de auxiliar na perda de peso.

Ko et al. (2005) analisaram o plasma de homens após o consumo de 150 mL de 9 sucos de fruta (pêra, maçã, laranja, uva, pêssego, cereja, kiwi, melão e melancia). Após 30 minutos do consumo destes sucos, exceto para suco de pêra, mostraram supressão efetiva da geração de espécies reativas de oxigênio no plasma dos indivíduos avaliados.

Pearson et al. (1999) observaram que o nível de lipoproteína de baixa densidade (LDL) oxidada em humanos diminuiu com a inclusão de extratos de maçã. Nesse trabalho, foi utilizada uma técnica *in vitro* com sangue humano. A pesquisa concluiu que o consumo tanto de maçãs *in natura* quanto do seu suco industrializado podem ser benéfico para a saúde, pois a inibição da oxidação do LDL pode prevenir o aparecimento da aterosclerose.

2.4 A importância nutricional dos compostos fenólicos

2.4.1 Os compostos antioxidantes

As publicações científicas citadas até o presente momento comprovam que ocorre aumento de formação de radicais livres em indivíduos expostos a situações patológicas, e que a ação de antioxidantes poderia neutralizar a ação deletéria sobre as células. Os radicais livres podem ser neutralizados ao terem suas sínteses e propagações interrompidas. Quando dois radicais livres encontram-se podem ceder elétrons para estabilizarem suas órbitas, ou através de sistemas antioxidantes do organismo que inibem a gênese dos radicais livres (OLSZEWER, NAVEIRA; GARCIA, 1997).

Existem dois grupos de antioxidantes, os enzimáticos sintetizados no organismo e os não-enzimáticos (BIANCHI; ANTUNES, 1999; SANTOS; CRUZ, 2001). O sistema enzimático é composto pela superóxido dismutase, catalase, NADPH-quinona oxidoreductase, glutathione peroxidase e glutathione reduzida (BIANCHI; ANTUNES, 1999). A glutathione reduzida, superóxido dismutase e glutathione peroxidase atuam como detoxificadora dos radicais livres antes que eles causem a lesão (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Os antioxidantes provenientes da dieta como o ácido ascórbico, tocoferol (vitamina E), carotenóides, flavonóides, selênio, ácido úrico e zinco constituem o sistema não enzimático (NELSON et al., 2003; BIANCHI; ANTUNES, 1999).

2.4.2 Os radicais livres e a função antioxidante

A produção de radicais livres

A oxidação nos sistemas biológicos ocorre devido à ação dos radicais livres no organismo. Estas moléculas têm um elétron isolado, livre para se ligar a qualquer outro elétron, e

por isso são extremamente reativas. Além de radicais livres existem moléculas altamente reativas não radicalares, tais como o peróxido de hidrogênio, que estão envolvidos em oxidação de biomoléculas. Elas podem ser geradas por fontes endógenas ou exógenas. Por fontes endógenas, originam-se de processos biológicos que normalmente ocorrem no organismo, tais como: redução de flavinas e tióis; resultado da atividade de oxidases, cicloxigenases, lipoxigenases, desidrogenases e peroxidases; presença de metais de transição no interior da célula e de sistemas de transporte de elétrons. Esta geração de radicais livres envolve várias organelas celulares, como mitocôndrias, lisossomos, peroxissomos, núcleo, retículo endoplasmático e membranas (MACHLIN; BENDICH, 1987).

As fontes exógenas geradoras de radicais livres incluem tabaco, poluição do ar, solventes orgânicos, anestésicos, pesticidas e radiações. Nos processos biológicos há formação de uma variedade de radicais livres (ERENEL; ERBAS; ARICIOGLU, 1993; RICE-EVANS; BURDON, 1993).

O ser humano saudável equilibra a formação dos radicais livres através dos sistemas antioxidantes, porém agentes físico-químicos, ambientais ou patológicos como poluentes atmosféricos, tabagismo, raios ultravioletas, radiação, substâncias químicas tóxicas e supernutrição, aumentam os níveis dos radicais livres favorecendo o estresse oxidativo (DEVASAGAYAM, 2004). No Quadro 2 podem ser observados os tipos de radicais livres gerados no organismo, a origem e sua reatividade. Estes radicais poderão causar alterações nas células, agindo diretamente sobre alguns componentes celulares. Os ácidos graxos poliinsaturados das membranas, por exemplo, são vulneráveis ao ataque de radicais livres. Estas moléculas desencadeiam reações de oxidação nos ácidos graxos da membrana lipoprotéica, denominadas de peroxidação lipídica, que afetarão a integridade estrutural e funcional da membrana celular, alterando sua fluidez e permeabilidade. Além disso, os produtos da oxidação dos lipídios da membrana podem causar alterações em certas funções celulares (RICE-EVANS; BURDON, 1993).

Espécie Reativa	Símbolo	Comentário
<i>Espécies reativas de Oxigênio</i>		
Superóxido	$O_2^{\cdot-}$	Gerado na mitocôndria, sistema cardiovascular e outros.
Radical hidroxil	$\cdot OH$	Altamente reativo, gerado durante a sobrecarga de ferro.
Peróxido de Hidrogênio	H_2O_2	Formado no organismo através de diversas reações e gera a espécie altamente reativa como o radical hidroxil.
Radical Peroxil	ROO^{\cdot}	Reativa, proveniente dos lipídios, proteínas, DNA, açúcares durante o dano oxidativo.
Hidroperóxido orgânico	$ROOH$	Reage com íons de metal na geração de espécies reativas.
Oxigênio Singlet	1O_2	Altamente reativo formado durante reações químicas.
Ozônio	O_3	Pode reagir com várias moléculas, aumenta a quantidade de oxigênio singlet.
<i>Espécies Reativas de Nitrogênio</i>		
Óxido Nítrico	NO^{\cdot}	Neurotransmissor, regula pressão sanguínea, aumenta potencial oxidante durante estado de patologia.
Peróxido Nítrico	$ONOO^{\cdot}$	Formado do NO e superóxido, altamente reativo.
Ácido Peróxido	$ONOOH$	Proveniente do peróxido nítrico
Dióxido de Nitrogênio	NO_2	Formado durante a poluição atmosférica.

Fonte: Adaptado de Devasagayam (2004).

QUADRO 2 - Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio de interesse biológico.

Os radicais livres podem provocar modificações nas proteínas celulares, resultando em sua fragmentação, ligações cruzadas (*cross linking*), agregação e, em certos casos, ativação ou inativação de certas enzimas devido à reação dos radicais livres com aminoácidos constituintes da cadeia polipeptídica. A reação de radicais livres com ácidos nucléicos foi observada, gerando mudanças em moléculas de DNA e acarretando certas aberrações cromossômicas (ERENEL; ERBAS; ARICIOGLU, 1993). Além destes efeitos indiretos, há a ação tóxica resultante de altas concentrações de íon superóxido e peróxido de hidrogênio na célula (HALLIWELL et al., 1995).

Mesmo a produção subtóxica de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio pode levar a alteração no estado redox celular e extracelular, e têm a capacidade de sinalizar mudanças nas funções celulares originais. Numerosos processos celulares incluindo a expressão gênica podem ser prejudicados por súbitas mudanças no balanço redox. Exemplo disso inclui a ativação de certos fatores de transcrição nucleares e a determinação da morte celular por apoptose ou necrose. O balanço redox da célula é, em circunstâncias normais, controlado geneticamente e mantido por um conjunto de sistemas enzimáticos, assegurando assim, que toda essa condição de redução prevaleça (MORAN; GUTTERIDGE; QUINLAN, 2001).

A detoxificação celular

Os antioxidantes são capazes de inibir a oxidação de diversos substratos, de moléculas simples a polímeros e biosistemas complexos, por meio de dois mecanismos: o **primeiro** envolve a inibição da formação de radicais livres que possibilitam a etapa de iniciação; o **segundo** abrange a eliminação de radicais importantes na etapa de propagação, como alcóxila e peróxila, através da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia (NAMIKI, 1990; SIMIC; JAVANOVIC, 1994).

Antioxidantes fenólicos funcionam como seqüestradores de radicais e algumas vezes como quelantes de metais (SHAHIDI, JANITHA; WANASUNDARA, 1992), agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os produtos intermediários, formados pela ação destes antioxidantes, são relativamente estáveis devido à ressonância do anel aromático apresentada por estas substâncias (NAWAR, 1985).

2.5 Ação dos fenóis da maçã sobre os radicais livres

2.5.1 Atividade antioxidante de diferentes classes de fenóis

Lee *et al.* (2004) avaliaram o conteúdo de cada antioxidante em maçãs Empire e sua contribuição para a atividade antioxidante total dessas frutas, determinadas pela análise da inibição do 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato que induziu geração de radicais superóxido em um modelo de cultivo celular e expressado em equivalentes de capacidade antioxidante da vitamina C (VCEAC). Os valores de VCEAC expressos em 100 g da maçã Empire foram: quercetina (60,05 g VCEAC) > ácido clorogênico (12,32 g) > floretina (7,41 g) > procianidina B2 (7,22 g) > vitamina C (6,61 g) > epicatequina (5,10 g). No extrato da maçã foi observado efeito protetor contra a inibição da comunicação intracelular (*gap-junctional* - envolvida no processo da carcinogênese) pelo H₂O₂ de maneira dose-dependente. A quercetina exibiu o efeito

protetor mais forte comparada aos outros antioxidantes da maçã, seguida por epicatequina, procianidina B2 e vitamina C, enquanto que, ácido clorogênico e fletina não apresentaram efeito significativo.

Vários métodos analíticos são disponíveis para determinar a atividade antioxidante total de extratos, com objetivo de avaliar a capacidade antioxidante total das amostras (BRANDWILLIAMS et al., 1995). A determinação da capacidade antioxidante de alimentos ainda apresenta sérias limitações, principalmente devido a não padronização de uma metodologia que apresente resultados representativos para uma ampla variedade de amostras naturais e industrializadas (HUANG; OU; PRIOR, 2005; PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). Giada e Mancini-Filho (2008) informam que todos os métodos apresentam vantagens e desvantagens. Desta forma, a atividade antioxidante *in vitro* de compostos fenólicos pode e deve ser avaliada com diferentes testes para diferentes mecanismos. Todavia, todos estes ensaios baseados em reações químicas diferenciadas oferecem resultados numéricos distintos e difíceis de serem comparados.

Os testes disponíveis na literatura variam basicamente quanto ao tipo de radicais gerados ou à espécie oxidante empregada e aos métodos usados para sua detecção e quantificação. Em todos esses ensaios, um radical gerado ou um oxidante reage com moléculas-alvo (antioxidante), para produzir cor, fluorescência, quimioluminescência, perda ou ganho de sinais de ESR (*Electron Spin Resonance*) ou outra mudança mensurável. A presença de antioxidantes altera esses sinais, o que permite sua análise quantitativa (VASCONCELOS et al., 2007). A ação antioxidante ocorre basicamente segundo dois mecanismos: o *Hydrogen Atom Transfer* (HAT) e o *Single Electron Transfer* (SET) que podem ocorrer isoladamente ou em paralelo. O mecanismo dominante em um dado sistema é determinado pela estrutura do antioxidante, suas propriedades, solubilidade e coeficiente de partição. Dentre esses dois mecanismos, o SET é o mais empregado na determinação da capacidade antioxidante de amostra de alimentos. Nos ensaios SET a

capacidade antioxidante é representada pela habilidade que o antioxidante possui para reduzir o composto oxidante em um tempo predeterminado (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

Atualmente existem diversos ensaios que empregam mecanismos SET, porém apresentam diferentes compostos oxidantes. Os principais ensaios são: o FRAP (*Ferric Reducing/Antioxidant Power*) que parte da redução do complexo Fe^{3+} -TPTZ (ferritripiridiltriazina) [2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina] a Fe^{2+} -TPTZ (ferroso-tripiridiltriazina) por redutores (AO) presentes na amostra, em meio ácido (pH =3,6) (BENZIE; STRAIN, 1996; BENZIE; STRAIN, 1999) o complexo férrico tripiridiltriazina é reduzido ao ferroso, mudando sua coloração para azul na presença de um antioxidante. Os resultados são expressos em capacidade antioxidante equivalente a 1mM do FeSO_4 (MORGADO; DURIGAM; SANTOS, 2008). Este é o método mais adequado para avaliação de maçã e seus produtos segundo conclusões de pesquisa do *French National Institute for Agricultural Research* (INRA).

O CUPRAC (Cupric Reducing/Antioxidant Capacity) que parte da redução de íons complexos Cu^{2+} para Cu^{1+} (MILLER et al., 1993) o TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) que parte da leitura da inibição do cátion radical ABTS [2,2-Azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato), sal de diamônio] produzido na reação e o ensaio do DPPH que parte do sequestro de radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picrila-hidrazila) (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995).

O ABTS é um método baseado na habilidade dos antioxidantes em capturar, a longo prazo, o cátion radical ABTS^+ . Os resultados são expressos em capacidade antioxidante equivalente a 1mM do trolox, que é um composto sintético, análogo da vitamina E, porém hidrossolúvel. É um método de elevada sensibilidade, prático e rápido e através deste pode-se medir a atividade de compostos de natureza hidrofílica (KUSKOSKI et al., 2005).

Recentemente, um novo ensaio SET foi desenvolvido empregando o poder de redução de espécies Ce^{4+} em meio ácido (H_2SO_4 0,3 mol/ L). Esse ensaio recebeu o nome de CeRAC (*Ceric ion Reducing Antioxidant Capacity*) e apresentou resultados superiores aos descritos pelas

metodologias anteriores (OZYURT; DEMIRATA; APAK, 2007). Porém, a grande limitação desses ensaios é o emprego da espectrofotometria como técnica de detecção, já que esta sofre forte interferência por parte de amostras coloridas e turvas (HUANG; OU; PRIOR, 2005; MILARDOVIC; IVEKOVIC; GRABARIC, 2005).

2.5.2 Efeitos comprovados de fenóis da maçã

Muitos dos fitoquímicos presentes na maçã foram intensamente estudados por grupos de pesquisa e muitos benefícios para a saúde foram comprovados. Procianidinas, epicatequinas e catequinas têm forte atividade antioxidante e a pesquisa comprova que essas substâncias inibem a oxidação da LDL *in vitro* (DA SILVA; LARANJINHA; FREITAS, 2003). Em ratos, a catequina inibe a formação e crescimento de tumores (EBELER et al., 2002). Sawa et al. (1999) relataram que o ácido clorogênico apresenta uma atividade seqüestradora (*scavenging*) potente para o radical alquil peróxil (ROO•). Os autores ainda afirmam que, comparado com outros 18 compostos antioxidantes (inclusive quercetina, ácido gálico e alfa tocoferol), o ácido clorogênico ficou em segundo lugar de poder antioxidante, ficando atrás somente da rutina. Sabendo-se que ROO• promove a carcinogênese, o ácido clorogênico vem a somar no efeito protetor da maçã contra o câncer.

A quercetina demonstra atividade antioxidante considerável e apresenta atividade protetora para ambos, os cânceres e doenças cardíacas. Esse bioflavonóide presente na maçã foi sugerido como responsável pela regulação da expressão do mutante p53 envolvido no processo do câncer de mama (LAMSON; BRIGNALL, 2000). O composto apresentou potencial antioxidante ao exercer papel protetor em células Caco-2 contra a peroxidação lipídica induzida por peróxido de hidrogênio e Fe²⁺ (PENG; KUO, 2003). Apesar de demonstrar esse efeito protetor na proliferação de linhagem celular de carcinoma de cólon e adenocarcinoma mamário, Escarpa e Gonzales (1998) afirmam que a quercetina em elevadas concentrações pode induzir a

proliferação celular (20 % em câncer de cólon e 100 % em câncer de mama). Polifenóis contendo anél fenólico são geralmente mais pró-oxidantes quando comparados a polifenóis contendo um anel catecol (HAN; SHEN; LOU, 2007). Baixas concentrações de quercetina ainda podem inibir a agregação plaquetária, mobilização de cálcio e fosforilação da proteína tirosina nas plaquetas e esse efeito pode ser benéfico em auxiliar na prevenção de doenças cardíacas (HUBBARD et al., 2003).

Lapidot, Walker e Kanner (2002) examinaram o potencial de fenólicos naturais na proteção de células pancreáticas do tipo beta (betaTC1 e HIT) contra o estresse oxidativo induzido por H₂O₂. A exposição simultânea das células ao H₂O₂ e aos fenóis, quercetina (10-100 µM), catequina (50-500 µM), ou ácido ascórbico (100-1000 µM), demonstrou amplificação da capacidade de inibição da proliferação dessas células.

As maçãs não apenas auxiliam na redução do risco de doenças cardíacas, câncer e asma, mas também tem seu consumo associado a baixo risco para o desenvolvimento de diabetes. Em um estudo nomeado de *Finnish study* que envolveu 10.000 pessoas, um risco reduzido de diabetes tipo 2 foi associado com o consumo da maçã (KNEKT et al., 2002).

Graziani et al. (2005) em estudo em nível de trato gastrointestinal compararam a formação de malonodialdeído (um índice utilizado para verificar peroxidação lipídica) em células MKN 28 provenientes de cultivo celular de células de estômago submetidas ao estresse oxidativo com dano à mucosa de ratos. Aplicando nestes grupos o extrato de maçã obtiveram diminuição da injúria às células do epitélio gástrico em 50 % para o cultivo celular e 40 % para as células dos animais, concluindo que o extrato de maçã possui efeitos tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

Ambos os estudos em animais e cultivo celular mostram que há associação entre compostos fenólicos encontrados na maçã e uma vasta variedade de efeitos que previnem doenças crônicas. Mais estudos se fazem necessários para desvendar os efeitos desses compostos *in vivo* assim como estudos prévios da biodisponibilidade de compostos específicos e a biodisponibilidade desses compostos embutidos na matriz da fruta (BOYER; LIU, 2004).

2.6 Experimentos *in vitro* com polifenóis

Veeria et al. (2006), investigaram se compostos estariam relacionados à diminuir o risco de câncer. Compararam resultados obtidos através do tratamento celular com extrato de maçã (em concentração que variou de 5 a 50 μM), floridizina, com uma mistura sintética de flavonóides que simulava o extrato de maçã ou ainda com 5 a 100 μM de flavonóides individuais em células HT29 que simulam o câncer de colon de humanos. Os resultados mostraram que o extrato da maçã inibiu a proliferação dessas células e modulou significativamente a expressão dos genes relacionados ao metabolismo xenobiótico.

Resultados de estudos *in vitro* devem ser cuidadosamente interpretados devido às mudanças na composição fitoquímica que ocorrem após a ingestão destes por modelos *in vivo*. Segundo Cancalo (2007). Estas mudanças incluem:

- 1) Reações enzimáticas na boca.
- 2) Interações químicas, enzimáticas, microbiológicas no trato digestivo com a formação de metabólitos e produtos da óxido-redução.
- 3) Absorção através da parede do trato gastrointestinal com transformações nos enterócitos.
- 4) Modificações no fígado e em outros órgãos para metabólitos com diferentes propriedades.
- 5) Absorção seletiva em órgãos específicos.

Com o objetivo de pesquisar a quantidade de polifenóis que alcança o cólon após a ingestão de suco de maçã e de amora, voluntários em uso de ileostomia tiveram o efluente da ileostomia coletado após a ingestão dessas bebidas. Polifenóis foram identificados e quantificados através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A maioria dos polifenóis ingeridos através do suco de maçã foram absorvidos no intestino delgado. Do total da dose oral de polifenóis de 0 a 33 % foram encontrados nas fezes em um tempo máximo de 2

horas (KAHLE et al., 2006). Esses resultados comprovam a boa biodisponibilidade dos polifenóis de suco de maçã.

Bohe et al. (2008) ao pesquisar o efeito de uma dieta pobre em gordura, rica em fibras dietéticas e rica em frutas e vegetais na recorrência de pólipos pré-cancerígenos no cólon e reto concluiu, após entrevistar 2000 homens sobre a frequência de alimentos com as características acima citadas e observou que o alto consumo de flavonóis foi correlacionado a uma redução de 76 % na recorrência dos tumores.

Outra pesquisa com 183.000 humanos residentes da Califórnia e Hawaii, de caráter multicêntrico e coort (NOTHLINGS et al., 2007) reportou que os entrevistados que consomem maior quantidade de alimentos ricos em flavonóis provenientes da dieta, tiveram redução significativa para o risco de câncer de pâncreas, quando comparados àqueles com menor consumo dessas substâncias. Relataram ainda que, desta amostra, aqueles que eram fumantes foram os que mais se beneficiaram da dieta rica em flavonóis. O kaempferol foi associado à maior porcentagem de redução de risco de câncer de pâncreas em pessoas não fumantes e naqueles com o hábito do tabagismo a correlação com a redução foi maior nos que consumiam flavonóis, quercetina e kaempferol.

Fulgoni et al. (2008), em pesquisa que verificou a associação do consumo de maçã e suco de maçã com o desenvolvimento da síndrome metabólica em adultos, indica que aqueles que consomem estes produtos tem diminuição de 27 % no risco de desenvolver a síndrome. A associação entre o consumo de flavonóides e doenças já foi relatada em 2002 por Knekt et al., que encontraram correlação positiva entre o consumo de quercetina e mircetina e diminuição no risco de diabetes tipo 2.

2.7 Hiperglicemia e estresse oxidativo

Em condições de hiperglicemia, a glucose é preferencialmente utilizada na via dos polióis (LEE; CHUNG, 1999), isto leva a um consumo de NADPH, o qual é necessário para a

regeneração da enzima glutationa redutase. Hiperglicemia é, indiretamente, a causa da depleção de glutationa (GSH) e esta é uma molécula importante, que quando depletada leva ao aumento do estresse oxidativo (PASAUGLU; SANCAK; BUKAN, 2004).

A hiperglicemia resulta na formação de produtos finais da glicação avançada (AGEs) por reações aminocarbonilo de natureza não-enzimática, que podem amplificar a capacidade inflamatória e, conseqüentemente, a geração de radicais livres (BENGMARK, 2007). Um aspecto que tem atraído o interesse de pesquisadores é a presença de compostos que apresentem propriedades de antiglicação e/ou antioxidantes nos alimentos, que possam oferecer potencial terapêutico para os portadores de diabetes ou de outras patologias associadas ao acúmulo degenerativo de AGEs. Embora nenhum alimento ou componente alimentar seja ainda especificamente indicado como redutor de AGEs *in vivo*, algumas substâncias demonstraram efeitos anti-AGE importantes e merecem investigações adicionais, como por exemplo os compostos fenólicos (BABU; SABITHA; SHYAMALADEVI, 2006; LUNCEFORD; GUGLIUCCI, 2005; PARI; VENKATESWARAN, 2003; MUSTATA et al., 2005). Cianidina-3 α -O-rhamnosideo e quercetina-3 α -O-rhamnosideo mostram inibição da α -glicosidase e da formação de AGEs *in vitro* (HANAMURA; HAGIWARA; KAWAGISHI, 2005).

2.8 Conseqüências do estresse oxidativo em células secretoras de insulina

A atividade das enzimas antioxidantes e do estresse oxidativo durante o processo secretório de insulina é de grande interesse bioquímico, devido às evidências da participação de espécies reativas no desenvolvimento de lesões primárias em várias patologias (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Essas lesões se devem à ação dessas espécies (radicalares e não-radicalares) em canais iônicos, material genético, sistemas enzimáticos essenciais à viabilidade celular, além da lipoperoxidação (reação autocatalítica que compromete a integridade da membrana celular). Aumento na geração de radical superóxido ou peróxido de hidrogênio foi

observado em diabetes *mellitus*. O envolvimento dos radicais livres na patogênese do diabetes *mellitus* do tipo 1 e tipo 2 foi documentado por Oberley, 1988 (CHI et al., 2007).

Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é apontado como responsável por múltiplos efeitos nas células B (ou beta) como a ativação de canais K_{ij} , em associação com inibição metabólica e aumento da permeabilidade da membrana (NAKASAKI et al., 1995). Pode interferir no metabolismo da glucose, com influência no potencial da membrana e levar a inibição da secreção de insulina (KRIPPEIT-DREWS et al., 1999). A exposição crônica das células B pancreáticas à alta concentração de glucose é acompanhada da redução na secreção e na expressão gênica da insulina (ROBERTSON et al., 2004) e redução da massa de células B por indução da morte celular (apoptose) (DONATH et al., 1999; PICK et al., 1998). Os mecanismos envolvidos na glicotoxicidade em células B ainda não estão bem estabelecidos, entretanto, existem várias evidências de um mecanismo alternativo envolvendo, pelo menos em parte, estresse oxidativo (IHARA et al., 1999; TAJIRI; MOLLER; GRILL, 1997; TANAKA et al., 1999). As ilhotas pancreáticas apresentam baixa atividade (GRANKVIST; MARKLUND; TALJEDAL, 1981) e expressão (LENZEN; DRINKGERN; TIEDGE, 1996) das enzimas antioxidantes e, portanto, consideradas estruturas altamente susceptíveis à ação dos radicais livres e espécies reativas não-radicalares. Tiedge et al. (1997) e Ihara et al. (1999) verificaram que ilhotas de ratos isoladas e expostas à alta concentração de glucose, apresentam um aumento na expressão da proteína heme oxigenase-1, da 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) e do 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), conhecidos marcadores de estresse oxidativo. Esses resultados foram importantes para confirmar o efeito da glucose no estresse oxidativo em ilhotas pancreáticas.

2.9 Modelos e marcadores do estresse oxidativo

O papel de ROS e RNOS tem sido claramente identificado na modulação de sinalização celular, proliferação, apoptose e proteção celular. Contudo, ROS e RNOS são também capazes

de atacar proteínas, polissacarídeos, ácidos nucleicos e ácidos graxos poliinsaturados resultando em dano celular e disfunção tecidual (HEYLAND et al, 2005).

Os marcadores do estresse oxidativo podem ser classificados em marcadores lipídicos, marcadores provenientes da glicação de carboidratos e marcadores protéicos.

Os marcadores lipídicos são aqueles conseqüentes da peroxidação lipídica, a exemplo do malondialdeído (MDA) e ácido tiobarbitúrico (TBAR's). Os marcadores provenientes da glicação de carboidratos geram radicais livres quando a hiperglicemia resulta na formação de AGEs por reações aminocarbonilo de natureza não-enzimática. Os marcadores protéicos são conseqüentes da degradação de proteínas e são exemplos as medidas de homocisteína, tióis e carbonilas plasmáticas.

Acworth, Oxon e Phil (2003) descreveram o mecanismo de ação desses marcadores afirmando que proteínas modificadas através da oxidação são geralmente degradadas pelo proteossomo 20S enquanto que histonas solúveis que causam oxidação e histonas da matriz do DNA sofrem reações catabolizadas pelo proteossomo 20S localizados no núcleo celular.

Os pró-oxidantes podem causar dano protéico por meio de mecanismos diretos e indiretos.

Mecanismo direto: Este modo de ação (mutante) não envolve o dano oxidativo a proteína *per se*. Neste, os pró-oxidantes podem causar mudanças na seqüência de base do DNA. Caso cada modificação de base for realizada em uma área de codificação do DNA (exon) e não for corrigida, a molécula de DNA será transcrita incorretamente. Um RNA mensageiro mutante pode resultar em uma proteína mutante contendo um aminoácido incorreto em sua primeira seqüência. Se este aminoácido incorreto ocorrer em uma parte essencial da proteína (por ex. o sítio ativo de uma proteína) a função desta proteína não será compatível com a função genuína daquelas provenientes de replicação sem erros. Este DNA modificado pode transmitir-se célula a célula pelo processo de mitose continuando assim o processo de mutação protéica (ACWORTH; OXON; PHIL, 2003).

Mecanismo indireto: Esse caminho (pós-transdução) envolve a ação de um pró-oxidante em uma proteína resultando em modificação do aminoácido terminal, formação de carbonilas, ligações cruzadas e cadeias de polipeptídios fragmentadas.

Expor ilhotas pancreáticas a alta concentração de glucose resulta em aumentada apoptose de células beta. Os efeitos adversos da glucose são atribuídos ao aumento da rota das hexosaminas (HBP – *hexosamine pathway*). A glucosamina, um precursor direto da HBP, aumenta a apoptose de células beta e esse processo pode ser revertido por inibidores da O-glicosilação. Estes resultados foram relatados em células RINm5f. O tratamento com glicosamina resultou na inibição da fosforilação com serina do receptor de insulina nessas células, este fato associou-se ao aumento da O-glicosilação nessas células (D'ALESSANDRIS et al., 2004; ANDREOZZI et al., 2004).

HRIBAL et al. (2003) concluíram em pesquisa com células RINm5f que a hiperglicemia crônica afeta negativamente a função dos receptores de insulina assim como a funcionalidade e a expressão deste hormônio.

Além de defeitos em receptores a funcionalidade das células podem ser afetadas pela exposição crônica à glucose através da produção de radicais livres. Esses, quando são produzidos em níveis fisiologicamente normais, não provocam alterações. Entretanto, em situações de estresse induzido pela presença de glucose em alta concentração essas células podem apresentar função alterada.

Outro fator para o aumento da produção de radicais livres e consequentemente, do estresse oxidativo é a presença de peróxido em altos níveis. O H_2O_2 pode ser utilizado como um desencadeador do estresse oxidativo, uma vez que é conhecido como fisiologicamente atuante durante a maior parte dos processos oxidativos (YOON et al., 2004). Em células de linhagem RIN a peroxidação induzida por H_2O_2 aumenta o influxo de íons cálcio na célula resultando em apoptose (ISHII et al., 2006). Kaneto et al. (1999) esclarecem que o estresse oxidativo gerado pela exposição curta de células beta ao H_2O_2 diminui a transcrição de insulina e do fluxo de

cálcio no citosol e na mitocôndria, e inibição da proliferação celular. Esta última foi relacionada ao aumento da produção e ativação da proteína p21 inibidora de enzima quinase dependente de ciclina (CDK), a qual controla o ciclo celular.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Analisar o efeito *in vitro* da capacidade antioxidante de suco clarificado e extratos de maçã aplicados em células RINm5f submetidas a diferentes condições de estresse oxidativo.

3.2 Objetivos específicos

Determinar a atividade antioxidante dos sucos e de diferentes extratos das cultivares de maçãs Gala e Fuji.

Determinar a citotoxicidade dos sucos e extratos das cultivares maçã Gala e Fuji sobre células secretoras de insulina.

Determinar o efeito antioxidante e citoprotetor dos sucos e extratos de epicarpo das cultivares maçã Gala e Fuji sobre células secretoras de insulina submetidas a estresse oxidativo induzido por elevada concentração de glucose.

Determinar o efeito antioxidante e citoprotetor dos sucos e extratos de epicarpo das maçãs Gala e Fuji sobre células secretoras de insulina submetidas a estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio.

Quantificar a secreção de insulina pelas células pancreáticas incubadas na presença de diferentes concentrações do extrato de epicarpo e diluições do suco das maçãs Gala e Fuji.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Processos

As amostras de maçãs dos cultivares Gala e Fuji foram adquiridas no comércio local. As células secretoras de insulina são derivadas de insulinoma de rato doadas, denominadas de linhagem RINm5F. Os reativos utilizados foram *pro analysis*.

4.1.1 Obtenção do extrato de maçã

As amostras de 2,0 kg de maçã foram classificadas em fruta inteira, epicarpo (casca) e mesocarpo (polpa). Em seguida, a fruta inteira e o mesocarpo foram triturados em processador de alimentos (METVISA – MPA) e a massa moída recolhida em béquer de vidro, homogeneizada e adicionada de solução extratora (EX) composta de álcool 90°: água: ácido fórmico 3,0 % (80 : 20 : 1) na proporção de 1:1 (p/v), conforme método descrito por McGhie, Hunt e Barnett (2005) seguida de trituração em *mixer* vertical durante 3 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram mantidas a -20°C durante 18-24 h. O álcool foi evaporado em evaporador rotativo. Extrato da casca (epicarpo) das frutas foi obtido pelo mesmo método com exceção da etapa de trituração. As frutas foram descascadas com faca, tomando-se os cuidados de desprezar a polpa no corte e padronizar a espessura. Para as duas cultivares (Gala e Fuji) os extratos foram divididos em: da fruta inteira, da polpa e da casca. Todos os extratos foram armazenados sobre congelamento e posteriormente descongelados para centrifugação (2500 rpm durante 5 minutos em centrífuga modelo BE 4004, LABSTORE) e filtração em capela de fluxo laminar utilizando filtro 0,22 µM com objetivo de torná-los estéreis e aptos a serem aplicados no ambiente celular evitando assim a contaminação microbiana. As amostras filtradas aplicadas nas células foram submetidas à um padrão de dois congelamentos.

4.1.2 O processamento do suco clarificado

Amostras de 1,0 kg de maçãs inteiras das cultivares Gala e Fuji foram utilizadas neste processo. O processo englobou as etapas de moagem, prensagem (3,0 kgf/cm³ durante 5 minutos) e tratamento enzimático de despectinização (Pectinex 3,0 mL/hL, Novozymes do Brasil) à 45°C durante 2 h, seguida de trasfega, filtração e clarificação com gelatina (VETEC – 3,0 g/hL) e bentonita (40,0 g/hL). O suco não passou pelo processo de pasteurização.

4.1.3 Meio de cultivo das células secretoras de insulina

As células RINm5f foram cultivadas em meio de cultura RPMI, contendo 11,1 mM de glucose, e suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB) (GIBCO Invitrogen Life Technologies), 10.000 U.I./mL de Penicilina e 10 mg/mL de Estreptomicina e mantidas a 37° C em uma estufa umidificada contendo 5 % de CO₂. Testes prévios demonstraram a necessidade da adição de antibiótico ao meio além do processo de filtração para garantir ausência de contaminação microbiana.

4.2 Análises de caracterização

4.2.1 Determinação de açúcares redutores totais

Para a determinação dos açúcares redutores e não-redutores dos extratos e sucos foi utilizado método de Somoghy-Nelson (SOMOGHY, 1944; NELSON, 1945).

4.2.2 Determinação de compostos fenólicos totais

O conteúdo de compostos fenólicos totais nos extratos e suco da maçã antes e após filtração foi medido através de modificações da análise colorimétrica de Folin-Ciocalteu

descrita por Singleton e Rossi (1965). Este método se baseia na produção de óxidos azuis de wolfrâmio (W_8O_{23}) e molibdênio (M_8O_{23}) a partir da oxidação de compostos fenólicos em meio básico. A concentração final dos óxidos é avaliada em espectrofotômetro (MOYER *et al.*, 2002). Os resultados foram expressos em $\mu\text{g/mL}$ de fenólicos totais, utilizando catequina como padrão ($200 \mu\text{g/mL}$).

4.2.3 Determinação da atividade antioxidante

Para a determinação da atividade antioxidante foi utilizado o método de FRAP, descrita por Benzie e Strain (1996) e Pulido, Bravo e Saura-Calixto (2000). O reagente de FRAP foi preparado por mistura de (a) tampão acetato de sódio 300 mM a pH 3,6; (b) solução de 2,4,6-tripiridil-s-triazine (TPTZ) 10mM em HCl (VETEC – Cód. 154) 40 mM; (c) solução de cloreto férrico 20 mM. Para obtenção do reativo FRAP, os reagentes mencionados acima foram misturados na proporção de 10 : 1 : 1 no momento da análise. Como padrão foi utilizado o reativo ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-carboxílico (TROLOX) em concentração apropriada com a diluição realizada para cada amostra. Em tubo de ensaio foram adicionados 3 mL do reagente FRAP e 1 mL do padrão ou amostra e a leitura da absorbância foi realizada à 593 nm, utilizando o reagente FRAP como controle zero (L1). As leituras foram monitoradas durante 6 minutos (L6) a cada 15 segundos. A variação de absorbância entre L6 e L1 foi calculada para cada amostra, sendo traduzida em um valor de FRAP por proporcionalidade com a de uma solução de concentração conhecida – TROLOX 1000 μM – testada em paralelo. O resultado foi expresso como μmol de redução de ferro/poder antioxidante (valor de FRAP) /g de amostra.

4.2.4 Curva de crescimento das células secretoras de insulina

Grupos de $2,0 \times 10^5$ células por cavidade foram semeadas em placa individuais de 24 cavidades e incubadas por 144 h. O crescimento das células RINm5F foi monitorado a cada 24 h através de contagem das células em câmara de Neubauer utilizando-se *Trypan Blue* a 1% diluído em PBS (NaCl 137 mM, KCl 3 mM, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1 mM e $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 6 mM) - pH 7,4 para avaliar a viabilidade celular (PERES; CURI, 2005). Com os valores obtidos do número total de células por dia (viáveis e inviáveis) obteve-se a curva de crescimento. Para o cálculo do tempo de dobramento foi utilizada a fórmula:

$$\text{PDT} = 1/r \dots \dots \dots (1)$$

$$r = 3,32(\log \text{Nh} - \log \text{Ni}) / (t_2 - t_1) \dots \dots \dots (2)$$

Onde:

r = taxa de multiplicação celular

Nh = número de células coletadas em um determinado período de tempo

Ni = número de células inoculadas no tempo 1 (inicial).

4.3 Experimentos

4.3.1 Avaliação da citotoxicidade do extrato de maçã pelo método de redução do MTT

Células RINm5F foram semeadas em microplacas de 96 cavidades em uma concentração inicial de 5×10^4 células/cavidade. As células foram cultivadas por 24 horas, período necessário para a adesão celular. Após esse período, o meio de cultura de cada cavidade foi retirado e substituído por 200 μL de meio na ausência ou presença de diferentes concentrações dos extratos e dos sucos (meio de cultura normal, GA e contendo 100 μM de peróxido de hidrogênio). A citotoxicidade de diferentes e diluições dos sucos de maçã Gala e Fuji (1:10, 1:50, 1:100, 1:250 e 1:500) e concentrações dos diferentes extratos: (5, 10, 50, 100 e 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi avaliada pela redução do MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]), de acordo com o método descrito por Mosmann (1983), exceto na presença de meio de cultura GA e contendo

peróxido onde foram utilizadas as concentrações (ou diluições) nas quais a célula apresentou viabilidade entre 90 % e 100 %. Esse método é utilizado como um indicativo da atividade metabólica, através da avaliação da integridade mitocondrial. O método é baseado na capacidade da enzima succinato desidrogenase mitocondrial em reduzir o MTT a cristais de formazan. As absorbâncias das amostras foram determinadas em espectrofotômetro Biosystems BTS-330 a 546 nm.

A partir do valor de absorbância de cada amostra foi determinada a porcentagem de viabilidade celular através da seguinte relação:

$$\%viabilidade = \frac{AbsAmostra}{AbsMédiaControle} \times 100 \dots\dots\dots(3)$$

Abs= absorbância obtida a 546 nm

Para evitar possível interferência dos compostos com potencial citotóxico (álcool e ácido fórmico) utilizados na solução extratora, um branco da solução extratora (controle EX) contendo volume equivalente ao encontrado na maior concentração de extrato foi utilizado e seus resultados foram monitorados durante os experimentos com os extratos de maçã sobre as células. Nos experimentos de viabilidade celular e produção de superóxido na presença de extrato de epicarpo e suco em alta concentração de glucose e em presença de 100 µM peróxido de hidrogênio foram feitos os mesmo procedimentos acima descritos. Nestes experimentos foram definidos os seguintes grupos controle:

Controle: meio de cultura contendo 11,1 mM de glucose

Controle EX: meio de cultura contendo 11,1 mM de glucose e a solução extratora na maior concentração testada no experimento.

Controle GA: células incubadas na presença de 30 mM de glucose e na ausência de extrato, suco e solução extratora.

Controle GA EX: células incubadas na presença de 30 mM de glicose, volume de solução extratora equivalente à concentração mais alta de extrato testada e na ausência de extrato ou suco.

Após o estresse induzido por peróxido de hidrogênio foi verificada a morfologia celular através de microscopia eletrônica de varredura (SHIMADZU, SSX-550). O pré preparo das amostras foi em metalizador SHIMADZU IC50 onde as mesmas foram cobertas por uma fina camada de ouro. Nesse ensaio foi observado o aspecto celular antes e após tratamento com suco de maçã Gala e Fuji na diluição de 1:50 (diluição que apresentou melhor resultado de viabilidade no MTT).

4.3.2 Indução do estresse oxidativo

O estresse foi gerado por dois modelos. 1) Exposição à elevada concentração de glicose: as células foram incubadas por 24 horas para adesão na presença de meio de cultura contendo glicose 11,1 mM. Após este período as células foram expostas por mais 48 horas na presença de 30 mM de glicose e ausência ou presença dos extratos e sucos de maçã. 2) Exposição ao peróxido de hidrogênio: as células foram incubadas por 24 horas para adesão. Após este período, foi adicionado ao meio peróxido de hidrogênio (100 mM) e diferentes concentrações dos sucos e extratos de maçã. As células foram incubadas por 60 minutos neste meio (indução de estresse).

Em ambos os modelos de estresse, a viabilidade celular foi avaliada pela redução do MTT.

4.3.3 Avaliação dos sucos e do epicarpo de maçã na produção de ânions superóxidos

A produção de superóxido pelas células secretoras de insulina foi determinada pelo método de redução do *Nitroblue Tetrazolium* (NBT) (SCHERENZEL et al., 1998). O NBT é solúvel em água e apresenta uma coloração amarelada. O $O_2^{\bullet-}$ pode reduzir o NBT levando a

formação de um precipitado azul (formazan – que é pouco solúvel em água) que, após extração com KOH 2M e DMSO (dimetilsulfóxido), a sua concentração pode ser avaliada em espectrofotômetro a 690 nm. Células RINm5F foram semeadas em microplacas de 24 cavidades em uma concentração inicial de 2×10^5 células/cavidade. As células foram cultivadas por 24 horas, período necessário para a adesão celular. Após esse período, ao meio de cultura presente em cada cavidade foi adicionado 1000 μ L contendo alta concentração de glucose (concentração final: 30 mM) e diferentes concentrações e diluições dos extratos e dos sucos, respectivamente (controle normal: 11,1 mM de glucose e ausência dos extratos ou suco). Para evitar possível interferência dos compostos com potencial citotóxico (álcool e ácido fórmico) utilizados na solução extratora, um controle zero foi utilizado e seus resultados foram monitorados durante os experimentos com os extratos de maçã sobre as células. Após 48 horas de incubação, o meio de cada cavidade foi desprezado e foram adicionados 300 μ L de solução de NBT 0,1 % preparado em solução de PBS contendo 10 mM de glucose. Após 60 minutos de incubação a 37° C, o meio de incubação foi desprezado e foi adicionado 300 μ L de metanol 100 %. Após 10 minutos de fixação, o metanol foi desprezado e sobre as células foram adicionados 125 μ L de KOH 2M e 150 μ L de DMSO. Após homogeneização, as absorbâncias das amostras foram determinadas em espectrofotômetro Biosystems BTS-330 a 690 nm.

4.3.4 Análise da funcionalidade celular: secreção de insulina

Células RINm5F foram semeadas em microplacas de 24 cavidades em uma concentração inicial de 5×10^5 células/cavidade. As células foram cultivadas por 24 horas, período necessário para a adesão celular. Foi feita determinação da concentração de insulina por radioimunoensaio no Laboratório de Secreção de Insulina do Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. A metodologia do radioimunoensaio baseia-se na competição entre a insulina (humana) marcada com o radioisótopo I125 e a insulina não-marcada (insulina de rato presente na amostra analisada) pelo anticorpo anti-insulina (1:200) derivado de cobaia (*guinea pig*). Uma

curva-padrão foi preparada utilizando-se concentrações conhecidas de insulina não-marcada. A partir dos resultados da curva padrão foi possível determinar a concentração de insulina presente nas amostras. O complexo antígeno-anticorpo foi precipitado pela adsorção do hormônio ao polietilenoglicol (PM 6000), uma modificação do método original, descrito por Morgan e Lazarow (1963), que utilizava uma anti-gamaglobulina de cobaia, produzida em coelho, como precipitante.

4.4 Análise estatística

Os resultados de análises de suco e extrato de maçã foram analisados estatisticamente através da aplicação de análise de variância (ANOVA) com pós teste de Tukey para a comparação múltipla das médias, ou teste t de Student. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) de dois ou mais experimentos independentes. O limite mínimo de significância adotado foi $p < 0,05$. Nos gráficos, o símbolo * foi utilizado quando comparado com o grupo controle ou com o grupo controle EX, e o símbolo # quando comparado com o grupo GA, ou com o grupo submetido à peróxido de hidrogênio.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Dosagem de açúcares redutores totais

A glucose foi utilizada como agente indutor de estresse nas células RINm5f, sendo assim, os extratos deveriam apresentar perfil adequado de açúcares, ou seja, a menor relação possível glucose/frutose.

Como componente de frutas e outros vegetais, a frutose é ingerida regularmente com a dieta. É sintetizada no organismo a partir da glicose, via sorbitol, e esse processo se relaciona com a manutenção do equilíbrio óxido-redutivo (BARREIROS; BOSSOLAN; TRINDADE, 2005). A absorção da frutose aumenta quando ela é ingerida sob a forma de sacarose ou quando misturada com a glicose, pois, durante a absorção da glicose, ocorre a abertura de pequenas junções, com movimento de fluido luminal por meio de vias paracelulares. Através desse movimento, pequenos solutos, incluindo a frutose, se movem passivamente, aumentando em 29% a absorção da frutose quando associada a soluções com glicose (SHI et al., 1997).

Existem alguns argumentos a favor da utilização da frutose em diabéticos como a independência em relação à insulina no transporte e distribuição de frutose e do sorbitol até a etapa inicial do metabolismo, absorção mais lenta da frutose e do sorbitol em relação à glicose, aumentos mínimos e transitórios da glicemia após a absorção de frutose e sorbitol, o fato de a síntese de glicogênio em humanos diabéticos acontecer de maneira adequada após a ingestão de frutose e sorbitol, independentemente do nível de glicose sanguínea, e o fato de a frutose e o sorbitol terem efeito anti-cetogênico (WANG; VAN, 1981).

Santos et al. (2005) citam a maçã Fuji como uma cultivar com baixo teor de dissacarídeos não redutores quando comparada a outras cultivares. As maçãs apresentam por porção valor

relativa 70 % de frutose em relação aos açúcares totais. Esta cetose se apresenta com teores elevados, da ordem de $6,31 \pm 1,55$ g/100mL, mas com uma dispersão menos evidente que a glucose e sacarose (WOSIACKI et al., 2005).

Na Tabela 2, podem ser observados os resultados médios do residual de açúcar nos extratos sem clarificação. As operações de centrifugação e filtração do extrato não afetam o teor dos açúcares. A fruta inteira e mesocarpo apresentaram teores de açúcares semelhantes nas duas cultivares, sendo que os valores variaram de 9,88 a 12,10 g/100g. Entretanto, os valores de açúcares do epicarpo foram na ordem de 3 vezes menos que na fruta inteira e no mesocarpo. No epicarpo da maçã o teor de compostos fenólicos é 3 a 10 vezes maior que o encontrado no mesocarpo (NICOLAS et al., 1994), esta parte da maçã pode reter em torno de 65 % dos compostos fenólicos totais da fruta (GUYOT et al., 1998). Portanto, por apresentar essas duas características combinadas, o epicarpo da maçã torna-se uma fração de resultados promissores devido alta concentração de compostos bioativos. Essa característica norteou a decisão de utilizar somente esta fração para o comparativo com o suco de maçã nos experimentos *in vitro* desta pesquisa.

Os valores de açúcares no suco de maçã clarificados correspondem com os dados da literatura que afirmam que pode existir uma variação entre 10,57 até 15,00 g/100mL nos sucos e os açúcares invertidos podem apresentar a proporção de frutose : glucose : sacarose de 1,00 : 0,21 : 0,55 (SANTOS et al., 2005).

TABELA 2 - Açúcares totais (g/100g) nos extratos da fruta e suas partes e dos sucos clarificados das cultivares Fuji e Gala (n=3).

Cultivares	Fruta inteira	Epicarpo	Mesocarpo	Suco
Fuji	$10,6 \pm 0,70$	$4,20 \pm 0,04$	$7,01 \pm 0,99$	$10,33 \pm 2,32$
Gala	$12,1 \pm 0,42$	$3,40 \pm 0,19$	$9,88 \pm 0,73$	$12,94 \pm 2,24$

5.2 Efeito dos processos no teor de fenólicos e na atividade antioxidante

Na Tabela 3 podem ser observados os valores de compostos fenólicos antes e após as operações de centrifugação e filtração que foram feitas com objetivo de tornar o extrato estéril, ou seja, evitar contaminação microbiológica no cultivo das células RINm5F. Foi verificado perda significativa após essas operações quando comparadas aos valores obtidos antes da filtração em especial quanto à maçã Fuji.

A maior perda dos compostos fenólicos (59,0 % em média) ocorre na fase de filtração e 16,0 % na fase de centrifugação do extrato da maçã Fuji. Na maçã Gala, a maior perda dos compostos fenólicos (35,0 % em média) acontece na fase de centrifugação e 33 % em média na fase de filtração do extrato.

TABELA 3- Efeito dos processos de filtração e centrifugação no teor de compostos fenólicos ($\mu\text{g/mL}$) nos extratos da maçã inteira, do epicarpo e do mesocarpo(n=3).

Cultivares		Operações unitárias				
		Testemunha	Centrifugado	Perda (%)	Filtrado	Perda (%)
Gala	Fruta Inteira	963,03 ^a ± 60,51	730,30 ^b ± 118,65	25,0	467,27 ^c ± 152,95	51,4
	Epicarpo	1456,32 ^a ± 27,32	1204,91 ^b ± 32,12	17,6	1299,90 ^b ± 218,20	10,0
	Mesocarpo	458,37 ^a ± 39,83	337,32 ^b ± 119,2	26,4	286,09 ^b ± 45,25	37,5
Fuji	Fruta Inteira	941,85 ^a ± 9,25	703,93 ^b ± 147,73	25,3	452,33 ^c ± 58,01	26,6
	Epicarpo	1598,76 ^a ± 79,19	1385,45 ^b ± 176,49	13,3	541,70 ^c ± 197,75	53,0
	Mesocarpo	674,29 ^a ± 10,86	620,24 ^b ± 84,59	8,0	280,56 ^c ± 50,53	50,4

Nota: letras diferentes indicam diferença significativa ao nível de 5% ($p < 0,05$).

A diminuição dos compostos pela centrifugação pode ser devido à associação desses com a parede celular que é retirada pelo processo. Em maçãs, os compostos fenólicos estão localizados nos vacúolos (97 %), e nas células da epiderme e sub-epiderme as suas concentrações são superiores às quantidades encontradas nos tecidos internos da fruta (NICOLAS et al., 1994). No caso da filtração, dependendo do material, os fenóis podem ficar retidos no filtro.

A concentração final de fenóis por mL de extratos e sucos é apresentada na Tabela 4.

Tabela 4 – Concentração final de fenóis em $\mu\text{g/mL}$ de extrato e suco de maçã utilizados nos experimentos.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	<i>cv. Gala</i>				<i>cv. Fuji</i>			
	Fruta inteira	Mesocarpo	Epicarpo	Suco	Fruta inteira	Mesocarpo	Epicarpo	Suco
5	0,005	0,037	0,016	0,002	0,007	0,019	0,005	0,002
10	0,010	0,075	0,032	0,005	0,013	0,040	0,010	0,005
50	0,050	0,373	0,159	0,027	0,070	0,194	0,050	0,028
100	0,100	0,747	0,317	0,055	0,128	0,390	0,100	0,057
250	0,251	1,867	0,792	0,138	0,320	0,970	0,249	0,144

As perdas de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante foram diferentes para as duas cultivares devido perfil fenólico diferente. A variação de conteúdo nesses parâmetros já é relatada por TSAO et al. (2003) e VAN DER SLUIS et al (2001), além de condições de cultivo e grau de maturidade (AWAD; DE JAGER; VAN WESTING, 2000; NOGUEIRA et al., 2003), fatores estes que fazem com que a atividade antioxidante da maçã varie consideravelmente.

Na Tabela 5 os resultados para a atividade antioxidante dos extratos foram semelhantes aos valores dos fenóis, ou seja, com perdas significativas nas duas operações, porém o efeito nesse parâmetro foi maior, com 58,2 % em média de diminuição para a centrifugação e 2,0 % em média para a filtração na maçã Gala. E para a maçã Fuji 25,0 % em média na centrifugação e 17,0 % em média na filtração.

TABELA 5 - Efeito dos processos de filtração e centrifugação na atividade antioxidante ($\mu\text{mol/g}$) de extratos da maçã inteira, do epicarpo e do mesocarpo (n=3).

Cultivares		Operações unitárias				
		Testemunha	Centrifugado	Perda (%)	Filtrado	Perda (%)
Gala	Fruta Inteira	24543,71 ^a \pm 139,60	7100,65 ^b \pm 70,37	71,0	6031,27 ^c \pm 152,55	4,4
	Epicarpo	16549,58 ^a \pm 40,44	11441,12 ^b \pm 141,87	30,9	11221,17 ^b \pm 218,20	2,2
	Mesocarpo	7939,77 ^a \pm 34,91	2095,87 ^b \pm 130,79	73,6	1985,92 ^b \pm 45,25	2,0
Fuji	Fruta Inteira	12719,08 ^a \pm 15,89	6563,37 ^b \pm 49,07	48,4	6074,80 ^c \pm 58,01	4,0
	Epicarpo	21606,29 ^a \pm 51,29	21003,68 ^b \pm 54,04	2,8	19040,71 ^c \pm 197,75	9,0
	Mesocarpo	9024,23 ^a \pm 40,33	6979,70 ^b \pm 99,13	22,7	3605,39 ^c \pm 50,53	45

Nota: letras diferentes indicam diferença significativa ao nível de 5% ($p < 0,05$).

Os ácidos fenólicos pertencem a duas classes distintas, ácidos hidroxibenzoico (HBA) e ácidos hidroxicinâmicos (HCA), os quais são derivados de duas moléculas não fenólicas que são o ácido benzóico e ácido cinâmico, respectivamente (RICE-EVANS; PACKER, 2003).

O conteúdo mais alto de derivados de HCA são frequentemente encontrados na parte externa de frutas frescas (MACHEIX, FLEURIET, BILLOT, 1990; TOMAS-BARBERAN, 2001; CHANG, 2000). O ácido clorogênico é mais abundante no mesocarpo em relação ao epicarpo, entretanto, sua distribuição é dependente do cultivar (LAPIERRE, POLLET, NEGREL, 1996; MAYR et al., 1995). A parte externa da maioria das plantas tem maior quantidade de HBA e HCA conjugados (FLEURIET, MACHEIX *in* RICE-EVANS, PACKER, 2003). Na maioria dos casos, os ácidos fenólicos não são encontrados no seu estado livre, exceto em níveis traço, e sim em formas combinadas, solúvel e ainda acumulado em vacúolos ou insolúvel quando está ligado à componentes da parede celular. Entretanto, algumas situações excepcionais podem resultar em ácidos fenólicos acumulados em sua forma livre (MACHEIX, FLEURIET, BILLOT, 1990) tais como as extrações em condições extremas, distúrbios fisiológicos da fruta, contaminação por microorganismos, anaerobiose, processamento de sucos e processamento de vinhos. A hidrólise das células das plantas causa acumulação destes na forma livre (RAPISARDA, 1998).

Os resultados encontrados sugerem que possivelmente a atividade antioxidante diminuída após centrifugação e filtração foi devido perda de derivados de HCA e HBA no epicarpo e ácido clorogênico no mesocarpo. Segundo a base de dados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2007) que quantificou flavonóides em alimentos, a epicatequina e a quercetina são os flavonóide de mais alto conteúdo em maçãs. Epicatequina encontra-se em nível de 4,1 mg em 100g da fruta inteira da maçã Gala e em maior quantidade na fruta inteira da maçã Fuji com 5,21 mg/100g em epicarpo de maçã os níveis podem chegar a 28,73 mg/100g. A quercetina está concentrada em maior quantidade no epicarpo das maçãs (*Malus domestica*) onde alcançam níveis de até 19,36 mg/100g nesta fração.

Se for considerado que a epicatequina e a quercetina são fenólicos de alta atividade antioxidante (RICE-EVANS et al., 1996) a explicação seria de que possivelmente foram compostos que ficaram retidos nos processos de centrifugação e filtração dos extratos. Quando a maçã passa por processamento, como no caso dos sucos, esses flavonóides diminuem para 4,71mg/100mL de epicatequina e 0,62mg/mL de quercetina enquanto que na fruta inteira da maçã Gala a quercetina está em nível de 4,57 mg/100g e 2,02 mg/100g na maçã Fuji parecendo ser esse o flavonóide mais prejudicado no processamento. Entretanto, na presente pesquisa essas informações somente seriam confirmadas através de análise do perfil fenólico por HPLC antes e após tratamento.

No caso do suco, apenas a operação de filtração foi determinada quanto ao efeito das perdas de compostos fenólicos e atividade antioxidante. O suco não foi centrifugado, porque se encontrava em consistência favorável para a filtração, pois recebeu tratamento enzimático (pectinases). Os sucos filtrados apresentaram resultados menores para fenóis totais e atividade antioxidante em comparação ao produto sem filtração (Tabela 6). Em pesquisa, Van der Sluis et al. (2002) afirma que os sucos de maçãs preparados a partir de três cultivares apresentaram menores concentrações dos compostos analisados quando comparados à maçã fresca. Mangas et al. (1997) ao verificar a diferença no perfil fenólico de sucos de maçãs ultra-filtrados com dois tipos diferentes de membranas, conclui que a procianidina B1 e um pico desconhecido pelo HPLC (provavelmente um derivado do ácido hidroxicinâmico) foram influenciados pelo tipo de membrana de filtração. Esses resultados indicaram que os flavonóides presentes na fruta podem ser extensamente extraídos no processamento do suco que utiliza a etapa de filtração. No processamento do suco, operações unitárias, prensagem e tratamentos enzimáticos proporciona condições propícias para a atividade da PPO onde HCAs e catequinas são os principais compostos fenólicos afetados (TALCOTT, HOWARD, 1999).

Esse efeito é somado ao fato de o suco utilizado nos experimentos não ser adicionado de antioxidantes sintéticos para evitar a interferência desses nas análises. A oxidação do ácido

clorogênico durante o processamento resulta em grande perda na concentração, pois apenas traços são encontrados em um suco de maçã oxidado, enquanto que 14, 23 ou 32 mg/100mL está presente no suco convencional, suco que passou por uma rápida pasteurização e suco não oxidado, respectivamente (MACHEIX, FLEURIET, BILLOT, 1990).

Após a filtração, o suco da maçã Gala obteve perda de 34,4 % em média de fenóis totais e 47,5 % em atividade antioxidante e o suco da maçã Fuji a perda de 20,4 % e 12 % em média para fenóis totais e a atividade antioxidante, respectivamente.

Segundo Van der Luis et al. (2002) o suco bruto obtido a partir da polpa de maçãs Jonagold após a prensagem e despectinização apresentou uma atividade antioxidante de 10 % e 3 %, respectivamente, da atividade encontradas nas maçãs frescas. Os níveis de flavonóides e ácido clorogênico no suco foram reduzidos para 3 % (catequinas) e 50 % (ácido clorogênico). Os autores justificam que a maioria dos antioxidantes foram retidos no bagaço, em vez de serem transferidos para o suco. Três cultivares de maçã foram testadas nessa pesquisa (Elstar, Golden delicious e Jonagold) e os métodos de produção tiveram efeitos semelhantes. Os resultados indicam que a operação unitária pode ter um impacto importante sobre a bioatividade dos produtos.

TABELA 6 - Efeito do processo de filtração nos teores de compostos fenólicos ($\mu\text{g/mL}$) e da atividade antioxidante ($\mu\text{mol/g}$) de sucos varietais de maçãs(n=3).

Suco varietal	Compostos fenólicos			Atividade antioxidante		
	Sem filtração	Com filtração	Perda (%)	Sem filtração	Com filtração	Perda (%)
Gala	224,83 ^a ± 3,27	147,54 ^b ± 2,02	34,4	2705,46 ^a ± 29,32	1420,88 ^b ± 27,67	47,5
Fuji	154,36 ^a ± 25,71	122,80 ^a ± 69,27	20,4	1472,02 ^a ± 11,62	1296,82 ^b ± 17,23	12,0

Nota: letras diferentes indicam diferença significativa ao nível de 5% (*p<0,05).

5.3 Análises biológicas

5.3.1 Caracterização da curva de crescimento das células RINm5f

Concomitante com o preparo e análise dos extratos e sucos, foi determinada a curva de crescimento celular, visando conhecer o comportamento da cultura, e a análise da viabilidade celular frente a diferentes concentração do suco e dos extratos de maçã.

A partir da contagem diária (durante 6 dias consecutivos) do número total de células/mL (ensaios realizados em triplicata) obteve-se a curva de crescimento celular característica da célula RINm5f (Figura 2).

Com os valores do número total de células por dia (viáveis e inviáveis) obteve-se a curva de crescimento. A fase Lag (0 a 48 horas) é caracterizada pela adaptação das células ao meio de cultura; a fase exponencial (48 a 72 horas) corresponde à máxima multiplicação, sendo a fase utilizada nos experimentos; na fase estacionária (96 a 120 horas) ocorre uma concentração celular constante atingindo o seu valor máximo; e a fase de declínio (120 a 144 horas), caracterizada pela escassez de substrato, acúmulo de metabólitos tóxicos e, conseqüentemente, a autólise celular (PERES; CURI, 2005).

5.3.2 Tempo de dobramento das células RINm5f

A partir da análise da curva de crescimento foi possível determinar o tempo de dobramento (fase logarítmica) com objetivo de conhecer o comportamento celular (número de células após determinado tempo de incubação) que foi de aproximadamente 15 horas. Autores citam que o tempo de dobramento da linhagem celular RINm5f é de aproximadamente 24 horas (PERES; CURI, 2005). O que pode justificar o tempo menor encontrado nessa pesquisa é que à medida que aumenta o número de passagens de uma linhagem, maior será a probabilidade de

acontecerem alterações que podem modificar o comportamento celular (MARTINS; BOAVENTURA; LIMA, 2005).

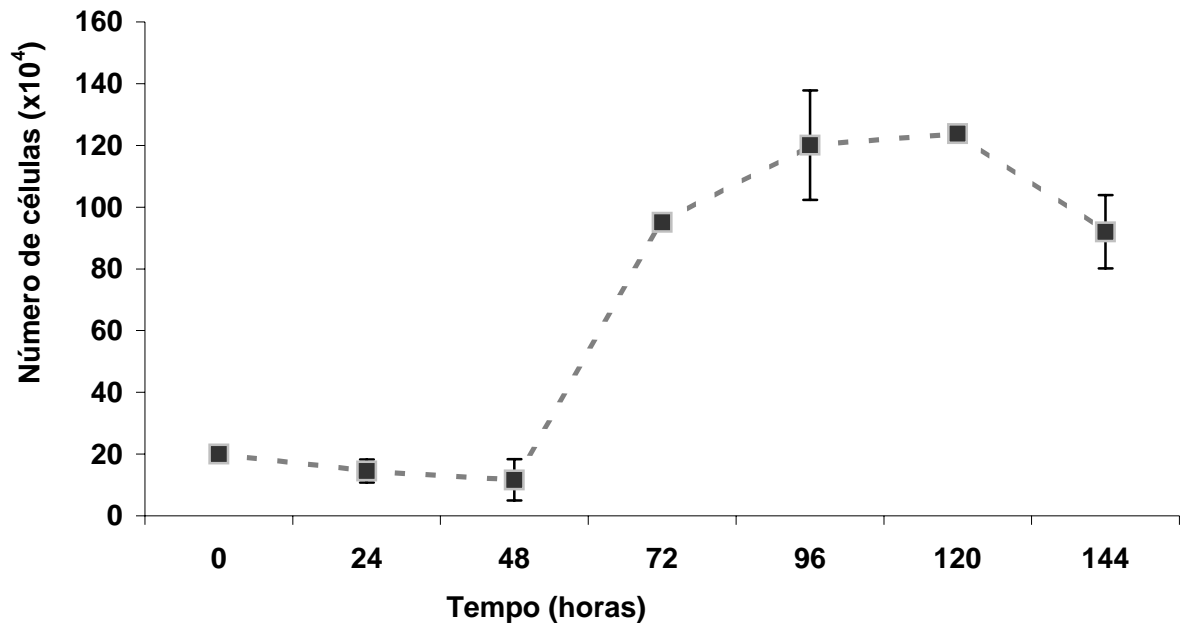


Figura 2. Curva de crescimento das células RINm5f secretoras de insulina. Células RINm5f (1×10^5 células / mL) foram incubadas a 37°C e 5 % de CO_2 por tempos variáveis (0, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas). Após os períodos de incubação, as células foram contadas em câmara de Neubauer, sendo os resultados obtidos expressos como média \pm erro padrão da média ($n=3$).

5.3.3 Viabilidade das células RINm5f

Viabilidade das células RINm5f durante curva de crescimento

A viabilidade celular foi superior a 90 % no tempo de 24 a 96 horas de incubação. Porém diminui 45 % após 120 horas em relação ao tempo zero. Após 144 horas de incubação a viabilidade das células reduziu 97 % em relação ao tempo zero (Figura 3).

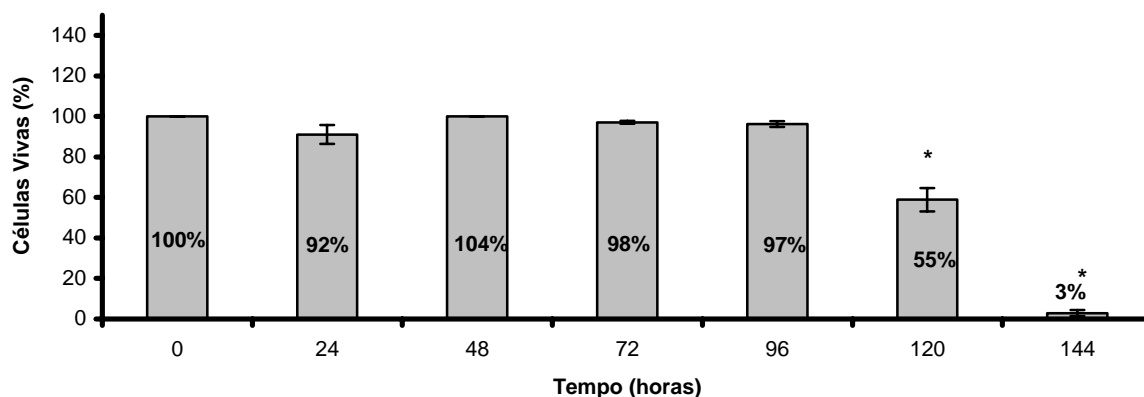


Figura 3. Viabilidade Celular das células RINm5f. Células RINm5f (5×10^4 células / mL) foram incubadas a 37° C e 5 % de CO_2 por tempos variáveis (0, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas). Após os períodos de incubação, apenas as células viáveis foram contadas em câmara de Neubauer utilizando-se o corante *Trypan blue* (1 %). Os resultados obtidos são expressos como média \pm erro padrão da média ($n=3$). * $p<0,05$ quando comparado ao tempo zero (100 % de viabilidade).

Viabilidade das células RINm5f na presença de diferentes concentrações de extrato e diluições do suco de maçã

Não foi verificada interferência dos compostos citotóxicos da solução extratora de fenóis durante os experimentos com os extratos fenólicos em células. Os valores de viabilidade celular apresentados na presença do branco da solução extratora e branco do meio de cultura utilizado no cultivo foram muito semelhantes. Esse resultado permitiu que tanto o branco do meio de cultura quanto o branco da solução extratora fosse utilizado como padrão no cálculo da viabilidade nos experimentos seguintes. Sendo assim, foi definido como controle comparativo o controle contendo solução extratora.

Foram selecionados extratos de fruta inteira, casca, polpa e suco da maçã da cultivar Gala e Fuji para a aplicação do método de redução do MTT. As diluições utilizadas foram 1:10, 1:50, 1:100, 1:250 e 1:500 para os sucos e 5, 10, 50, 100 e 250 μM para os extratos, sendo as diluições feitas sempre em meio de cultura RPMI-1640. O número de células utilizadas no ensaio assim como as concentrações dos extratos e suco foram definidos com base na literatura, em trabalhos que utilizaram o mesmo método (CHINNICI, 2004; ORTIZ; SHEA, 2004; SCHAEFER et al., 2006; VEERIAH et al., 2006).

Efeito do extrato de fruta inteira da maçã Gala e Fuji

Os extratos e suco da maçã não apresentaram citotoxicidade, sendo que em alguns casos a viabilidade celular aumentou quando comparada à viabilidade celular apresentada pelo controle. Esse resultado pode ser explicado devido o MTT além de ser uma análise com objetivo de verificar a viabilidade celular ainda fornece informações a respeito do metabolismo mitocondrial. Portanto, quando colocadas em concentrações maiores de extrato contendo grande quantidade de açúcar, conforme citado na Tabela 2, esse nutriente possivelmente induziu o aumento da oxidação de glicose e a viabilidade celular se apresentou maior.

Na Figura 4A, pode ser observado o efeito do extrato de fruta inteira da maçã Gala aplicado nas células.

Em relação ao controle (100 % de viabilidade) as concentrações de 100 e 250 µg/mL do extrato da fruta inteira da maçã Gala se apresentam significativamente diferentes com valores de * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ respectivamente, quando comparados ao controle EX.

O extrato de fruta inteira da maçã Fuji, exposto na figura 4B, não apresentou diferença na viabilidade em todas as concentrações testadas, exceto na de 250 µg/ mL, onde as células apresentaram tendência de aumento de 28% não significativo na viabilidade em relação ao controle EX.

Portanto, extratos de fruta inteira de maçã Gala e Fuji apresentaram comportamento semelhante quanto ao aumento da viabilidade (27% em média) na maior concentração testada. Diluições abaixo de 100 µg/ mL não afetaram a viabilidade celular.

Efeito do extrato de mesocarpo da maçã Gala e Fuji

Ao determinar a viabilidade celular após aplicação do extrato do mesocarpo da fruta do cultivar Gala (Figura 4C), a única concentração que se observou comportamento significativamente diferente ($p < 0,05$) em relação ao controle EX foi o extrato em concentração

de 50 µg/mL. Esse extrato apesar de ter quantidade de compostos fenólicos muito semelhante quando comparado ao da maçã Fuji (286,09 µg/mL *versus* 280,56 µg/mL) apresentou atividade antioxidante menor provavelmente pela diferença de classe dos fenólicos em sua composição. Verifica-se que em concentrações menores e medianas (5, 10 e 50 µg/mL) ou menos tóxicas parecem benéficas para a viabilidade celular. Entretanto a partir de 100 µg/mL, devido à concentração de compostos fenólicos se apresentar mais alta provavelmente interferem na citotoxicidade destes compostos, fazendo com que exista uma tendência à redução da viabilidade celular nessas concentrações.

Efeito semelhante ocorreu para o mesocarpo de maçã Fuji, entretanto, sem efeito citotóxico, pois a viabilidade se manteve próxima de 100% nas maiores concentrações. Na Figura 4D é possível concluir que as concentrações mais baixas apresentaram melhor efeito quanto ao aumento da viabilidade em média 22% nos extratos de 5 e 10 µg/mL.

Efeito do extrato de epicarpo da maçã Gala e Fuji

Em relação ao extrato do epicarpo da maçã Gala (Figura 4E) a viabilidade celular não apresentou alteração em relação ao controle em nenhuma das concentrações utilizadas. Assim, o epicarpo de maçã Gala foi utilizado nas análises biológicas em concentrações de 10, 50 e 100 µg/mL.

Ao aplicar o método de redução do MTT no epicarpo da maçã Fuji (Figura 4F) os resultados foram significativamente diferentes quanto à viabilidade nas concentrações a partir de 50 µg/ mL quando comparadas ao controle na presença de solução extratora (EX).

Na concentração de 5 e 10 µg/mL a viabilidade celular não foi alterada. Na concentração de 10 µg/mL a viabilidade aumentou 7 % mostrando-se a concentração ideal para manutenção da viabilidade. Já na concentração de 50, 100 e 250 µg/mL a viabilidade foi de 88 %, 82 % e 81 % respectivamente. Ou seja, quanto maior a concentração do extrato menor foi a viabilidade na presença do extrato de epicarpo da maçã Fuji. Essa ocorrência pode ser explicada pelo fato da

alta concentração de compostos fenólicos considerável na maçã Fuji e, em especial no epicarpo desta. Isso possivelmente reflete o efeito citotóxico dos polifenóis em altas concentrações. Flavonóides e compostos fenólicos são fortes agentes redutores que sob condições *in vitro* na presença de íons metálicos como o cobre e o ferro podem atuar como próoxidantes (HODNICK et al., 1988; CAO, SOFIC; PRIOR, 1997; SUGIHARA et al., 1999). Em pesquisa que avaliou o efeito anti e próoxidante de substâncias antioxidantes em células HIT (LAPIDOT, WALKER E KANNER, 2002) a catequina (50-500 μM), quercetina (10-100 μM) e ácido ascórbico (100-1000 μM) quando adicionados no cultivo celular submetido ao estresse induzido por glucose oxidase (GO- indutor da produção de H_2O_2) não mostrou efeito protetor. Ao contrário do esperado, estas substâncias amplificaram o efeito inibitório nas células tratadas com GO. A adição de baixas doses desses não apresentou efeito significativo. Ainda nesse estudo, nos cultivos celulares não tratados previamente com GO estes antioxidantes causaram inibição da proliferação quando em altas concentrações (quercetina > 50 μM , catequina > 250 μM e ácido ascórbico > 800 μM).

Após aplicação do teste do MTT em todos os extratos de maçã Gala e Fuji elaborados o epicarpo foi a fração da fruta selecionada para utilização nos demais experimentos devido apresentar melhores resultados em todos os parâmetros pesquisados, além de melhor correlação quando feito um paralelo com a situação real do consumo da fruta. Fazendo um comparativo com o modo de consumo de maçã comprova-se se existe prejuízo no consumo da maçã sem casca. O alto teor de compostos fenólicos, atividade antioxidante e atividade antiproliferativa de cascas de maçã indicam que eles podem trazer benefícios à saúde quando consumidos e devem ser considerados como uma valiosa fonte de antioxidantes (WOLFE; WU; LIU, 2003). Além disso, ao aplicar o epicarpo nos experimentos existe a perspectiva de obter resultados que poderão elucidar questões para pesquisas que avaliem a sua aplicação em humanos na forma de composto nutracêutico. Publicações de pesquisas *in vitro* com o objetivo de conhecer a atividade antioxidante do epicarpo de maçã e seus componentes utilizam células de câncer hepático HepG2, células de câncer de mama MCF-7 e principalmente Caco-2 de câncer de cólon. A partir

da casca de maçã He e Liu (2007) isolaram e identificaram compostos com atividade funcional antiproliferativa em todas essas linhagens de células humanas. Apesar da avaliação da atividade antiproliferativa não fazer parte dos objetivos da presente pesquisa esses resultados podem ser visualizados a partir da aplicação da técnica do MTT. Nas concentrações onde a viabilidade encontra-se menor (a partir de 50 $\mu\text{g/mL}$), possivelmente possa ser resposta do efeito antiproliferativo do extrato de epicarpo.

Efeito do suco das maçãs Gala e Fuji

Ao analisar a viabilidade celular para o suco da maçã Fuji (Figura 4H) obteve-se resultado semelhante ao observado no suco da maçã Gala (Figura 4G), ou seja, nenhuma das diluições apresentou diferente comportamento quando comparadas ao controle, exceto 1:10 onde a viabilidade reduziu 30 % em relação ao controle.

As diluições de 1:50, 1:250 e 1:500 quando comparadas à de 1:10 apresentou tendência a aumentar a viabilidade celular, portanto pode-se concluir que diluições acima de 1:10 podem apresentar melhores resultados quanto à viabilidade celular, possivelmente devido à diluição maior dos compostos fenólicos no meio de cultura evitando seu efeito citotóxicos e mantendo a viabilidade celular muito próximo do controle.

Para o suco de maçã Gala e Fuji foram considerados adequados utilizar as diluições de 1:50, 1:100, 1:250 para serem aplicados procedimentos seguintes em células. Três diluições diferentes foram selecionadas para o tratamento das células com o intuito de verificar a possível relação dose-dependente.

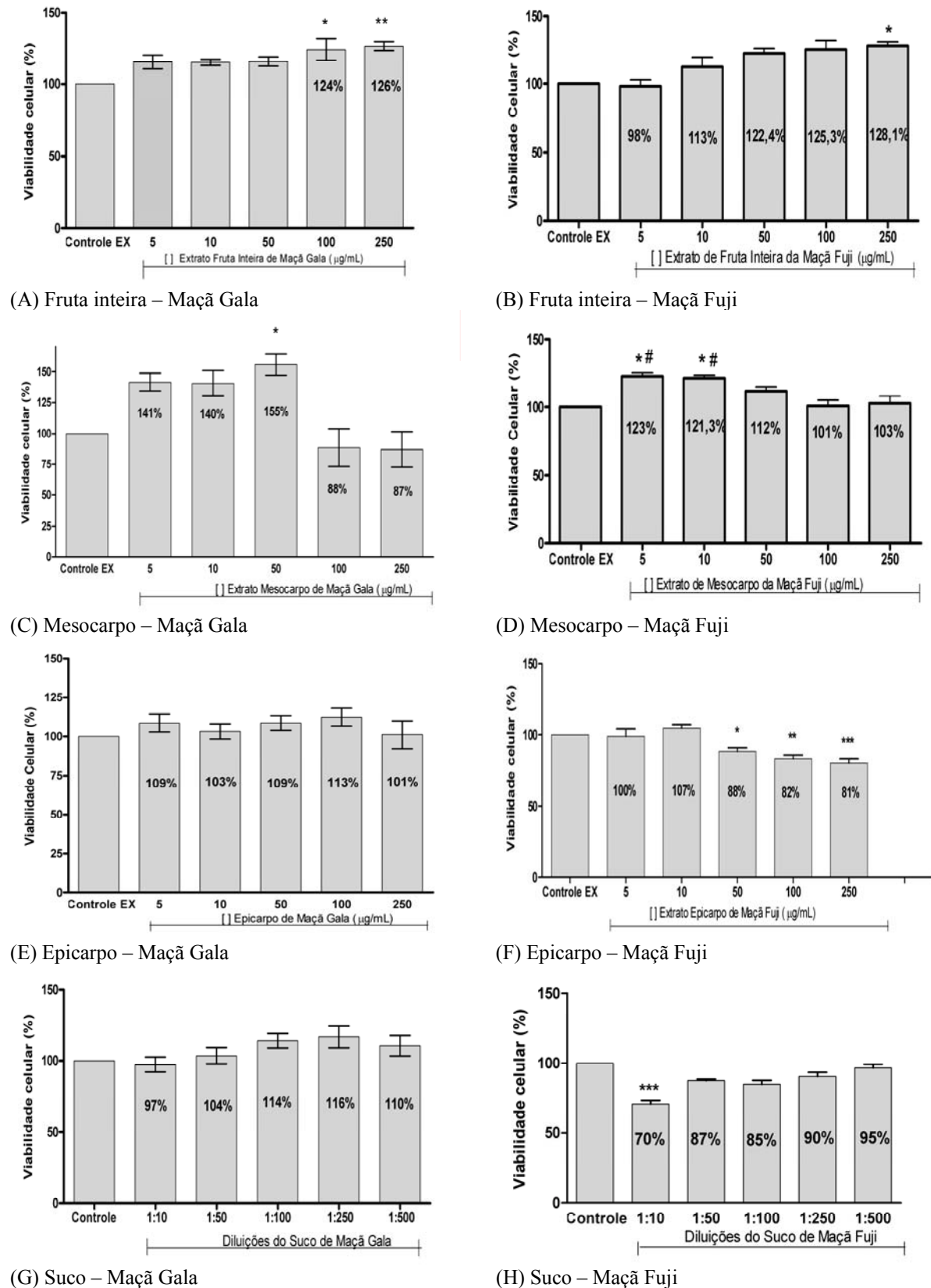


Figura 4. Viabilidade das células RINm5f em diferentes concentrações do extrato e diluições do suco clarificado de maçã e na ausência de estresse oxidativo. Células RINm5f (5×10^4 células / mL) foram cultivadas por 48 horas a 37°C e 5 % de CO_2 em meio RPMI 1640 suplementado com 10 % de soro fetal bovino e concentrações variáveis do extrato (5, 10, 50, 100 e 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$), e diluições do suco (1:10, 1:50, 1:100 e 1:250 e 1:500). Após o cultivo, a viabilidade celular foi determinada pelo método de redução do MTT. Os resultados obtidos são expressos como média \pm erro padrão da média de dois experimentos independentes ($n=10$). * $p<0,05$; ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ quando comparado com grupo controle EX ou ao grupo controle.

Viabilidade celular na presença de estresse induzido por alta concentração de glicose

Efeito do estresse induzido por alta concentração de glicose e presença do epicarpo das maçãs

Gala e Fuji

A viabilidade celular foi estatisticamente diferente do controle e não aumentou quando as células foram incubadas na concentração de 10 µg/mL do extrato de epicarpo da maçã Fuji (Figura 5A). Quando o controle EX foi adicionado de GA a viabilidade foi de 65 % e após adicionar o extrato de epicarpo ficou em 61 %.

O extrato de epicarpo da maçã Gala apresentou diferença significativa quanto à viabilidade celular em todas as concentrações (Figura 5B). O grupo de células incubadas à concentração de 10 µg/mL foi o que apresentou melhor resultado quanto à viabilidade, sendo esta maior que a viabilidade do controle. A viabilidade celular diminuiu consideravelmente quando as células foram incubadas nas demais concentrações e com presença de glicose alta. Dados da literatura confirmam que fitoquímicos naturalmente presentes em baixas doses em frutas, vegetais, ervas e temperos oferecem muitos benefícios à saúde, mas estes compostos não são efetivos ou seguros quando consumidos em altas doses (LIU, 2003).

Em relação ao extrato de epicarpo de maçã Gala a viabilidade celular foi significativamente diferente de GA somente na concentração de 10 µg/mL. Uma hipótese para esse resultado seria o fato do extrato de epicarpo da maçã Gala apresentar maior concentração de açúcares totais. Esse dado, já mostrado na Tabela 2, pode ser indicativo de que houve soma dos açúcares em alta concentração no extrato com a glicose em alta concentração adicionada ao cultivo, representando aumento importante na viabilidade celular devido ao aumento simultâneo da atividade mitocondrial percebida através do MTT. Nos grupos com maior concentração de epicarpo seria esperado aumento de viabilidade uma vez que esses apresentam maior conteúdo de compostos fenólicos, entretanto nessas concentrações não foi verificada diferença em relação ao grupo GA EX. Este resultado pode ser um indicativo de atividade próoxidante decorrente da

alta concentração de polifenóis e açúcares que potencializaram o estresse induzido por alta glucose no meio.

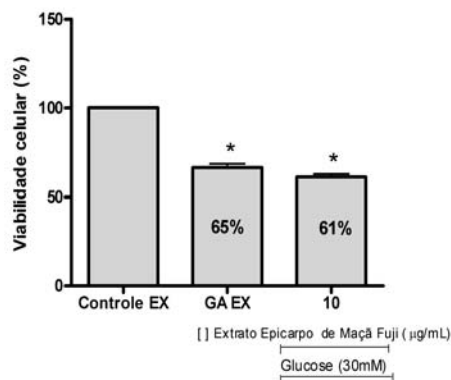
Efeito do estresse induzido por alta concentração de glucose e presença do suco das maçãs Gala e Fuji

O suco da maçã Fuji (Figura 5C) apresentou diferença significativa em relação ao controle GA na diluição de 1:250. A viabilidade celular aumentou inclusive em relação às outras concentrações apresentando diferença significativa estatisticamente. Nas demais diluições testadas a viabilidade não foi afetada. Nota-se ainda que a viabilidade celular diminuiu quando comparados os seguintes grupos: células submetidas ao GA em relação à células submetidas ao meio de cultura sem GA, indicando a presença de estresse oxidativo e, conseqüentemente, morte celular com a adição de glucose em alta concentração no meio.

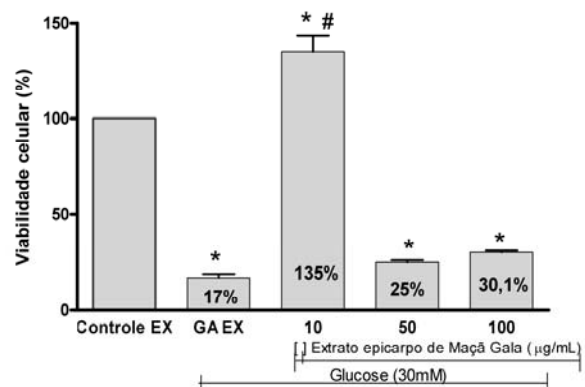
Ao incubar as células na presença de glucose alta a viabilidade celular diminuiu em 54% conforme mostrado na Figura 5D. Na diluição de 1:50 de suco de maçã Gala houve melhora desse resultado, aumentando a viabilidade em 23 % em relação à GA. Nas diluições de 1:100 e 1:250 a viabilidade aumentou sendo de 71 e 70 %, respectivamente. Portanto, o suco de maçã Gala foi capaz de manter a viabilidade das células após o estresse com glucose alta, mas sem reverter totalmente o estresse causado por GA. Todas as concentrações foram estatisticamente diferentes quando comparadas ao controle e à GA.

Schaefer et al. (2006) compararam o efeito de misturas reconstituídas de polifenóis isolados (rutina, floridizina, ácido clorogênico, ácido cafeico e epicatequina) com o suco de maçã frente ao dano oxidativo induzido por menadiona em células Caco-2. Após 24 horas de incubação, o estresse foi mais eficientemente reduzido nas misturas reconstituídas que variavam de 1 a 100 µg/mL, entretanto o nível de espécies reativas diminuiu a uma taxa similar em ambos. O mesmo autor no ano de 2006 constatou em pesquisa que ao utilizar suco de maçã em

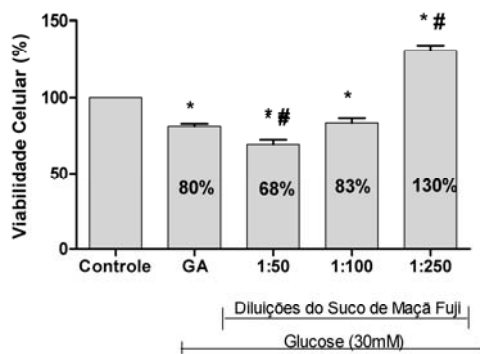
concentrações de 50 a 250 μg obteve resposta na modulação do dano ao DNA e no estado de redução (*redox status*) em uma concentração dose dependente em 24 horas de incubação em células de linhagem de câncer de cólon. Entretanto, o efeito dose-dependente não foi comprovado na presente pesquisa, sendo que no caso da maçã Fuji os sucos que encontravam-se mais diluídos foram os que apresentaram melhor resposta frente ao estresse oxidativo induzido por GA e no suco da maçã Gala apesar de apresentar proteção ao estresse gerado por GA, não existiu diferença entre as diferentes diluições.



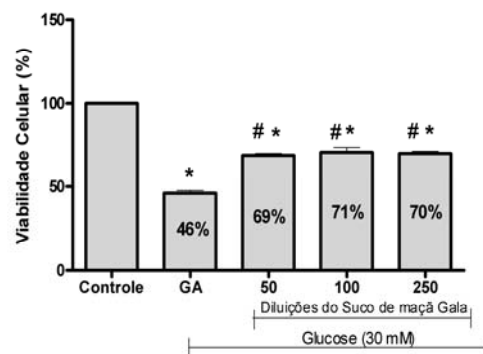
(A) Epicarpo– Maçã Fuji



(B) Epicarpo – Maçã Gala



(C) Suco – Maçã Fuji



(D) Suco – Maçã Gala

Figura 5. Viabilidade das células RINm5f em diferentes concentrações do extrato e diluições do suco clarificado de maçã Fuji e Gala quando submetidas à alta concentração de glicose. Células RINm5f (5×10^4 células / mL) foram cultivadas por 48 horas a 37°C e 5 % de CO_2 em meio RPMI 1640 suplementado com 10 % de soro fetal bovino e 30mM de glicose em concentrações variáveis do extrato (5, 10, 50, 100 e 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e diluições do suco (1:10, 1:50, 1:100 e 1:250 e 1:500). Após o cultivo, a viabilidade celular foi determinada pelo método de redução do MTT. Os resultados obtidos são expressos como média \pm erro padrão da média de dois experimentos independentes ($n=10$). * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ quando comparado com grupo controle EX ou ao grupo controle. # $p<0,05$, # $p<0,01$ quando comparado com o grupo GA.

5.3.4 Produção intracelular de superóxido induzido com alta concentração de glicose

Efeito da produção intracelular de superóxido em modelo de estresse oxidativo na presença de extrato de epicarpo das maçãs Gala e Fuji

O extrato de epicarpo da maçã Fuji, se apresentou com tendência à redução na produção de superóxido quando as células foram incubadas na concentração de 50 µg/mL (Figura 6A). Nesta concentração a maçã Fuji teve produção 24 % menor, entretanto não significativa ($p>0,05$).

O melhor resultado foi obtido com o extrato de epicarpo da maçã Gala que se apresentou significativamente diferente do controle em todas as concentrações. Na concentração de 100 µg/mL a porcentagem de produção de superóxido foi de 62,14 % ($p<0,01$), enquanto que na concentração de 50 µg/mL foi 73,87 % ($p<0,01$). A concentração mais baixa apresentou porcentagem de produção de 88 % ($p<0,05$). Nesse caso observa-se uma relação dose-dependente, pois quanto maior a concentração do extrato maior foi o efeito protetor (Figura 6B). Esse extrato, apresentou resposta positiva ao diminuir a produção intracelular de superóxido apresentando tendência à comportamento dose-dependente, entretanto este efeito não se refletiu em aumento de viabilidade quando as células foram incubadas na presença de GA e concentrações diferentes do extrato, exceto em 10 µg/mL. Quando células são submetidas ao estresse por GA outros mecanismos de dano celular além da produção de superóxido estão envolvidos, como a rota das hexosaminas, rota da proteína C kinase e aumento da formação de metilglioxal (XUE et al., 2008). Valko et al. (2007) ainda acrescentam que a hiperglicemia estimula a formação de ROS derivados de uma variedade de fontes que incluem a fosforilação oxidativa, a autooxidação da glicose, lipoxigenase, citocromo P450 monooxigenases e óxido nítrico sintetase, levando a formação de uma grande variedade de ROS além do superóxido. Esses fatores podem estar relacionados à causa da diminuição da viabilidade celular verificada na Figura 4B.

Efeito do estresse induzido por alta concentração de glicose e presença do suco das maçãs Gala e Fuji

A redução do NBT obtida quando as células foram incubadas na presença dos sucos foi diferente nas duas cultivares. Para a cultivar Fuji (Figura 6C) a menor produção de superóxido foi de 47,5 % na concentração de 1:250 ($p < 0,05$), nas demais diluições não observou-se resposta significativa. Houve tendência de diminuição quando cultivadas na diluição de 1:100 onde a produção de superóxido foi de 76,4 % e aumento não significativo da produção na diluição 1:50 para 109 % em relação ao controle. Esses resultados coincidem com aqueles apresentados na análise da viabilidade na presença de GA, onde existiu aumento da viabilidade na diluição 1:250 de suco Fuji. Portanto, a diluição de 1:250 se apresentou eficaz na viabilidade celular e na diminuição da produção de superóxido. Esse fato é hipoteticamente explicado pela presença em menor quantidade de açúcar tanto no suco da maçã Fuji quando comparado ao suco da Maçã Gala como pelo fato do mesmo encontrar-se em diluição maior, causando menos estresse, proveniente de glicose em alta concentração, à célula incubada.

A maçã Gala (Figura 6D) apresentou resultados diferentes em relação à maçã Fuji, pois nenhuma das diluições foi significativa para redução da produção de superóxido intracelular ($p > 0,05$) nessa diluição. Houve uma tendência à proteção nas diluições de 1:100 e 1:250. Nestas mesmas diluições foi observado aumento da viabilidade na presença de GA, também não significativas.

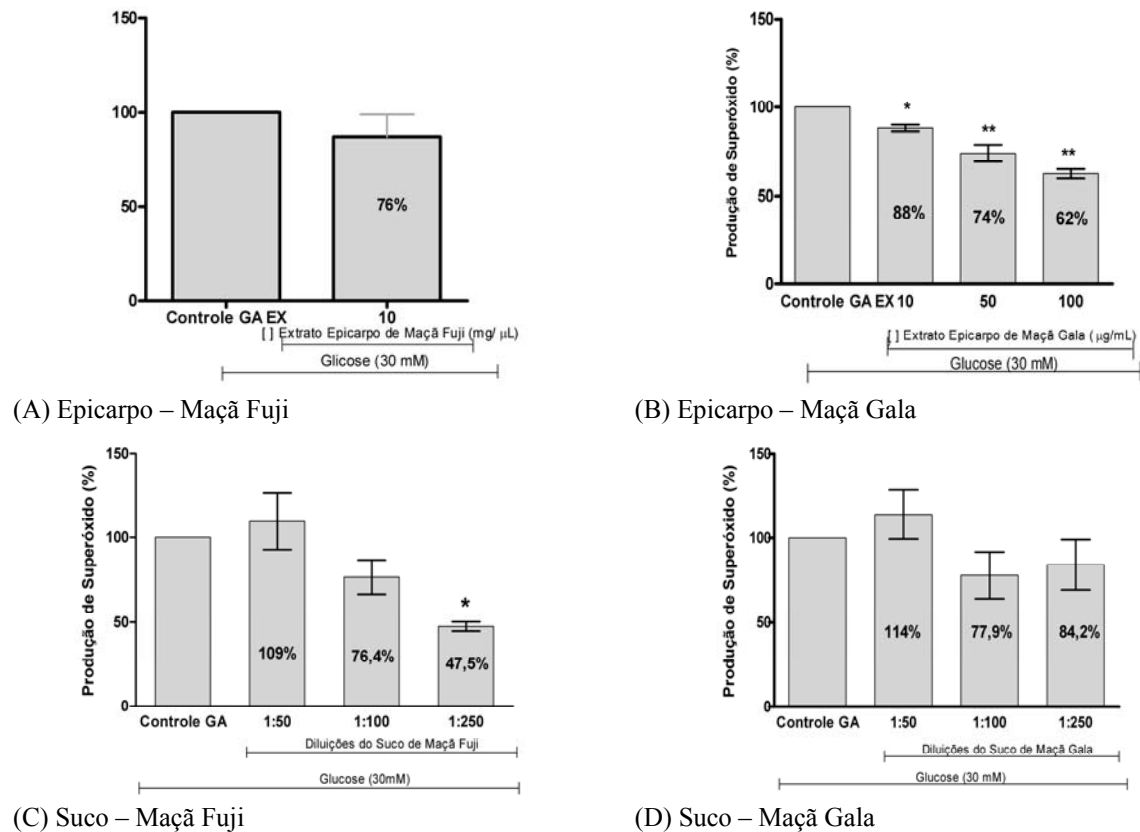


Figura 6. Efeito do extrato e suco de maçã Fuji e Gala na produção intracelular de superóxido. Células RINm5f (2×10^5 células/mL) foram cultivadas por 48 horas a 37°C e 5 % de CO_2 em meio RPMI 1640 suplementado com 10 % de soro fetal bovino e 30mM de glicose em concentrações variáveis do extrato (10, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) ou suco de maçã (1:50, 1:100 e 1:250). Após o cultivo, a porcentagem de redução do NBT foi determinada pelo método de redução do NBT. Os resultados obtidos são expressos como média \pm erro padrão da média de dois experimentos independentes ($n = 10$). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ quando comparado com grupo controle GA controle e GA EX.

5.3.5 Viabilidade celular na presença de estresse induzido por peróxido de hidrogênio

Quando as células foram submetidas à estresse induzido por peróxido de hidrogênio tiveram viabilidade celular reduzida em 65,4 %. O extrato de epicarpo de maçã Gala não foi capaz de aumentar a viabilidade celular em concentrações de 10 a 100 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 7A). A viabilidade celular se mostrou maior na presença da concentração mediana de 50 $\mu\text{g/mL}$ de extrato de epicarpo, pois 41,8 % das células encontravam-se viáveis. Na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ a viabilidade foi de 27,9 %, demonstrando uma tendência da potencialização do efeito citotóxico do H_2O_2 . Portanto, apenas as concentrações de 10 e 50 $\mu\text{g/mL}$ conseguiram reverter em parte o estresse celular causado pelo peróxido, mas em nenhum destes a viabilidade foi significativamente diferente da viabilidade celular na presença de peróxido. No estresse gerado

pela presença de GA somente a concentração de 10 µg/mL reverteu o estresse, nas demais concentrações observa-se o mesmo comportamento apresentado pelas células na presença de peróxido de hidrogênio.

Pesquisas utilizando outras linhagens de células pancreáticas como a HIT e TC1 (LAPPIDOT; WALKER; KANNER, 2002) obtiveram resultados semelhantes ao verificado em 100 µg/mL. A exposição de células ao H₂O₂ levou à significativa inibição de proliferação (menor viabilidade). A exposição simultânea de H₂O₂ e fenóis, quercetina (10-100 µM), catequina (50-500 µM), ou ácido ascórbico (100-1000 µM), levou a intensificação de inibição da proliferação. Em concentrações mais elevadas, estes compostos inibiram a proliferação, mesmo na ausência de H₂O₂ adicionado. Este efeito pró oxidante é atribuível à geração de H₂O₂ através da interação dos compostos fenólicos adicionados e ainda com substâncias como componentes indefinidos do meio de cultura.

Em cultivos celulares o comportamento de flavonóides ou ácidos fenólicos enquanto antioxidante e protetor celular do dano oxidativo ou como pró oxidante e inibidor da proliferação celular é dependente da natureza do estresse oxidativo (LAPPIDOT; WALKER; KANNER, 2005). O efeito somatório do peróxido de hidrogênio com íons metálicos do meio de cultura, os quais são subsequentemente reduzidos pela suplementação de compostos fenólicos criando um ciclo redox gera um radical hidroxil citotóxico (HAREL; KANNER, 1989), podendo ser essa a causa de redução de viabilidade observada. Mares-Guia et al. (2007) encontraram resultados semelhantes na diminuição da viabilidade celular quando expôs células RINm5f ao peróxido de hidrogênio relatando 33 % de viabilidade nessa condição. Entretanto, a substância utilizada para tratamento pós exposição ao peróxido era uma vitamina lipossolúvel (Vitamina E), a qual foi eficiente na capacidade citoprotetora. A vitamina E aumentou o número de células viáveis para 92 %.

O extrato de epicarpo de maçã Fuji na concentração de 10 µg/mL (Figura 7B) foi incapaz de reverter o estresse gerado pelo peróxido. A viabilidade celular na presença de peróxido foi de

30 %. Na presença de extrato com 10 µg/mL foi de 23,3 %. Isso sugere que nessa concentração não existiu efeito protetor e sim um possível efeito pró oxidante conforme já foi mostrado anteriormente nos resultados do outro modelo de estresse (GA).

Efeito do estresse induzido por peróxido de hidrogênio na presença do suco das maçãs Gala e Fuji

O suco de maçã Fuji reverteu parcialmente o estresse, mantendo a viabilidade celular em 84,8 % na diluição de 1:50 e em 86,5 % na diluição de 1:100. Esse resultado foi inclusive estatisticamente diferente quando comparado ao H₂O₂ (# p<0,001). A diluição de 1:250 apresentou resultado de 70 % de células viáveis após a incubação (Figura 7D). O suco mais diluído não apresentou a mesma tendência, pois teve a viabilidade diminuída em relação ao controle e não diferente da viabilidade apresentada na ausência de suco e presença de peróxido de hidrogênio.

O suco de maçã Gala apresentou resultados muito semelhantes ao da maçã Fuji. Na diluição de 1:50 a viabilidade foi de 90 % (p<0,001), portanto maior que a viabilidade diante do estresse induzido por peróxido que era de 70 % e não é diferente do grupo controle mostrando a capacidade de reverter completamente o estresse. Na diluição de 1:100 a viabilidade também teve aumento significativo para 85,1 % (p<0,05) e novamente a viabilidade teve queda na diluição de 1:250 para 70 % (p<0,001), ou seja, nessa diluição não houve efeito protetor (Figura 7C).

Os resultados obtidos na diluição de 1:50 de suco Gala e Fuji na presença de estresse induzido por H₂O₂ foi a que melhor se correlacionou com os resultados do estresse induzido por GA. Esta diluição mostrou ação citoprotetora nos dois modelos de estresse.

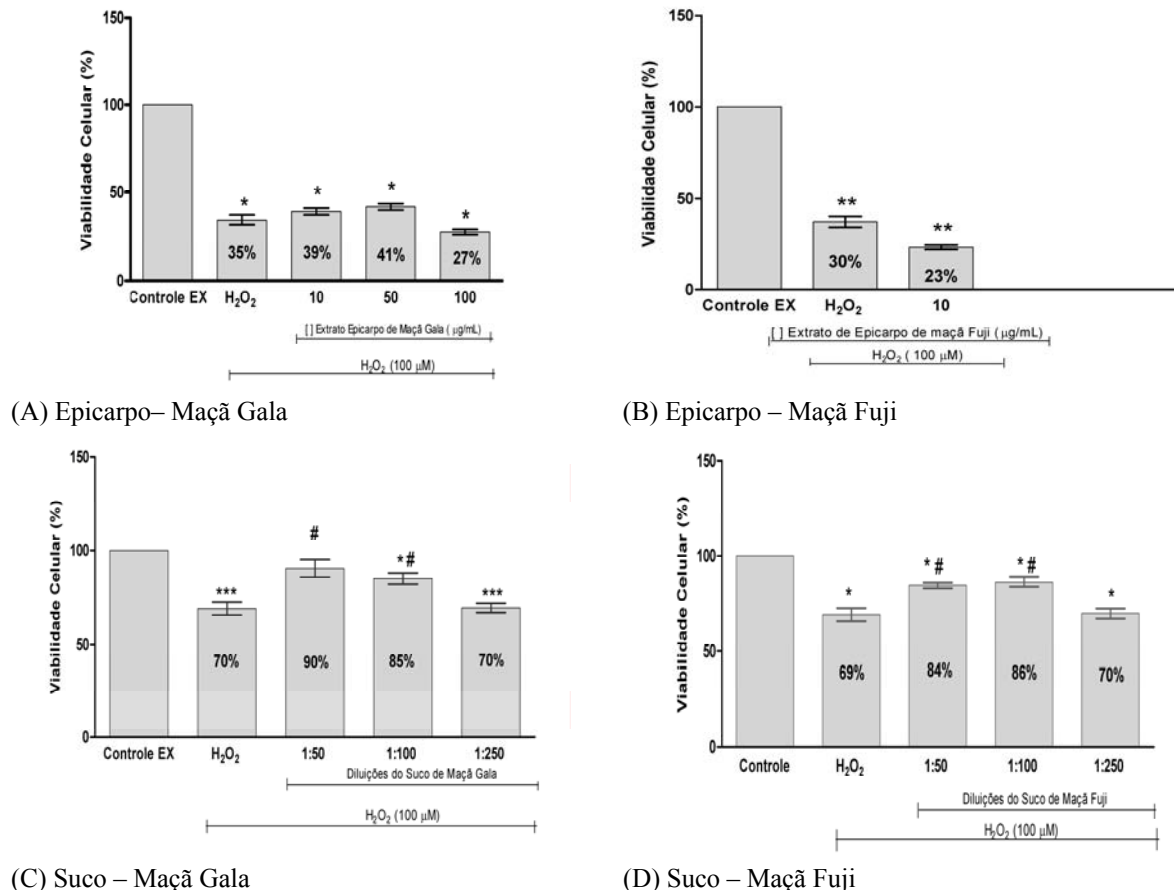


Figura 7. Efeito do extrato de epicarpo e suco de maçã Gala e Fuji na viabilidade celular quando submetido ao H_2O_2 . Células RINm5f (2×10^5 células/mL) foram cultivadas por 48 horas a $37^\circ C$ e 5 % de CO_2 em meio RPMI 1640 suplementado com 10 % de soro fetal bovino, concentrações variáveis do extrato (10, 50 e 100 $\mu g/mL$) ou suco de maçã (1:50, 1:100 e 1:250) e 100 mM de peróxido de hidrogênio. Após o cultivo, a viabilidade celular foi determinada pelo método de redução do MTT. Os resultados obtidos são expressos como média \pm erro padrão da média de dois experimentos independentes ($n = 8$). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ quando comparado com grupo controle EX. # $p < 0,05$, # $p < 0,01$ quando comprado com o grupo H_2O_2 .

Efeito do suco de maçãs Gala e Fuji na morfologia celular

O peróxido de hidrogênio está relacionado com parada do ciclo celular (inibição da proliferação celular) e indução de apoptose (formação de corpos apoptóticos, fragmentação de membrana) em diversas células somáticas e germinativas cultivadas *in vitro* (CHAUBE et al., 2005). Um dos efeitos característicos do peróxido de hidrogênio é o comprometimento da morfologia celular. Em células endoteliais (HUVEC) mantidas em cultura, por exemplo, 200 μM de peróxido de hidrogênio em pesquisa de Valen et al. (1999) causou, de acordo com tempos variáveis de exposição, contração celular, desaparecimento de vimentina e tubulina (efeito agudo) e desorganização do citoesqueleto (efeito crônico).

A avaliação das imagens feitas com microscopia eletrônica de varredura (Figura 8) determina que o Controle (8A) apresentou morfologia normal, células aderidas e contato intercelular preservado. O grupo de células ao qual foi adicionado peróxido de hidrogênio (8B) teve indícios de retração citoplasmática (contração celular), menor interação intercelular e perda do aspecto característico (estrelado). O grupo celular adicionado de suco da maçã Fuji (8C) apresentou indícios de potencialização do efeito do peróxido de hidrogênio, maior perda de adesão celular e diferença de contraste evidenciado por células mais translúcidas. Portanto, apesar de manter a viabilidade celular em 84,8 % na diluição de 1:50 o suco da maçã Fuji não apresentou melhora nos aspectos morfológicos celulares.

O grupo de células adicionado de suco de maçã Gala apresentou morfologia alterada, entretanto apresentou alguns contatos intercelulares e maior adesão quanto comparado ao grupo peróxido de hidrogênio, estas características podem ser indicativas de tendência à reversão da morfologia celular. O suco da maçã Gala (Figura 8D) apresentou aumento significativo na viabilidade celular pelo MTT na presença de peróxido de hidrogênio e nessa diluição a morfologia das células apresentou semelhança com as células do controle (Figura 8A)

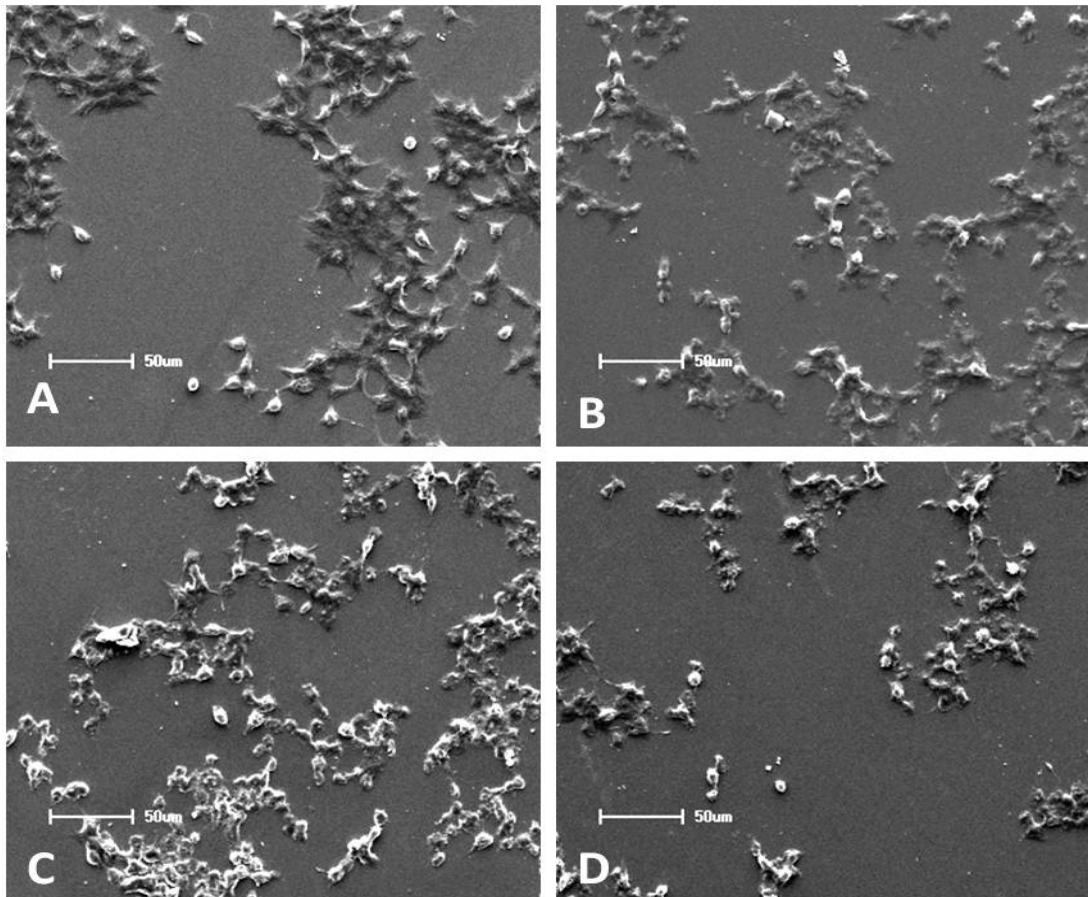


Figura 8. Aspecto morfológico das células RINm5f antes do tratamento (A) após tratamento com $100\mu\text{M}$ de peróxido de hidrogênio (B), efeito do tratamento e presença de suco da maçã Fuji na diluição de 1:50 (C) e efeito do tratamento e presença de suco de maçã Gala na diluição de 1:50 (D).

Efeito do epicarpo das maçãs Gala e Fuji na secreção de insulina pelas células RINm5f

Quando as células do cultivo foram submetidas à alta concentração de potássio apresentaram o comportamento esperado, explicado pela fisiologia normal de células secretoras de insulina. Nas células B pancreática a glucose é transformada em piruvato e entra na mitocôndria. A oxidação mitocondrial aumenta a taxa de ATP/ADP, o que fecha os canais de potássio ATP-sensíveis (KATP) e causa a despolarização da membrana plasmática, abrindo os canais de cálcio. O influxo de cálcio na célula estimula a secreção de insulina (ASHCROFT, RORSMAN, 1990). O aumento de potássio de 6 para 15 ou 30 mM causou um significativo aumento na secreção de insulina marcada nos experimentos de PRAZ et al. (1982) que utilizaram células da linhagem RINm5f. A presente pesquisa utilizou 30 Mm de potássio que gerou

aumento significativo estatisticamente em relação ao controle em todos os casos onde a secreção de insulina pelas células foi analisada (controle positivo).

O epicarpo da maçã Fuji (Figura 9A) apresentou aumento médio de 43,7% da secreção de insulina em relação ao controle, valor esse sem efeito significativo. Epicarpo de maçã Gala (Figura 9B) apresentou resultado semelhante ao aumentar a secreção de insulina em média 43% para as três concentrações testadas, todas sem valor significativo estatisticamente.

Efeito do suco de maçãs Gala e Fuji na secreção de insulina

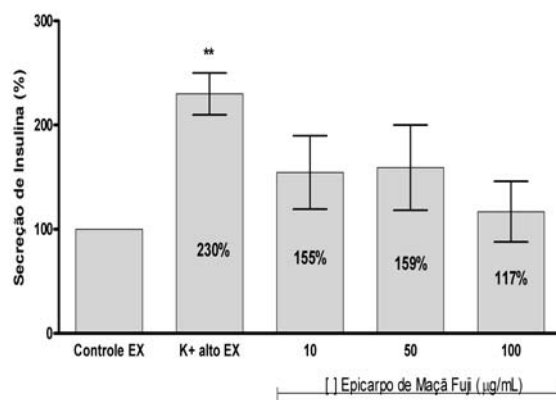
Os sucos tiveram resultados mais expressivo, pois na diluição de 1:50 de suco de maçã Fuji (Figura 9C) a secreção de insulina aumentou 52% em relação ao controle, nas demais diluições a secreção aumentou, mas sem efeito significativo estatisticamente. Suco de maçã Gala (Figura 9D) aumentou em média 50% da atividade secretora de insulina do cultivo celular, entretanto diferente do suco da maçã Fuji, as maiores diluições (1:100 e 1:250) foram as responsáveis pelo melhor efeito, mas sem apresentar relação dose-dependente.

Utilizando células secretoras de insulina principalmente os fitoterápicos são alvo de pesquisas. Kim e Kim (2008) descrevem o ginseng coreano vermelho como um produto auxiliar no tratamento da diabetes por estimular a secreção de insulina de uma forma independente da glicose em ilhotas pancreáticas isoladas de rato. Persaud et al. (1999) estudaram o efeito da *Ginnema silvestre* no estímulo à secreção de insulina em células da linhagem HIT-T15 e obtiveram resultados positivos. Provasi et al. (2001) atribuíram efeito hipoglicemiante à *Averrhoa carambola* (*Oxiledaceae*).

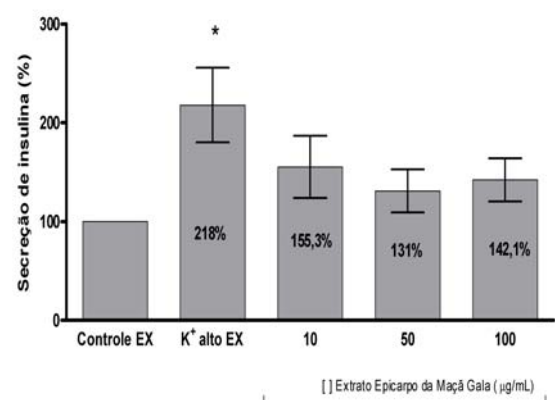
Polifenóis de diferentes fontes alimentares são citados como efetivos agentes em modelos de resistência à insulina e estudos relacionados à atividade das células secretoras de insulina. Wu et al. (2004) e Stote e Baer (2008) referem-se ao chá verde como indutor da sensibilidade à insulina. Al-Awadi et al. (2004) estudaram os efeitos dos polifenóis do vinho tinto na resistência à insulina. Perez et al. (2007) atribui esse mesmo efeito aos polifenóis do *Aloe vera*. Anderson et

al. (2008) referem-se aos polifenóis do cinamomo. Strobel et al. (2005) referem que a miricetina, quercetina e a catequina galato inibe a entrada de glicose em adipócitos de ratos isolados para essa pesquisa. Jalil et al. (2008) associam o efeito dos polifenóis e metilxantinas do cacau ao resultado de diminuição na taxa de glicemia pós prandial de ratos obesos. Em pesquisa de Jakab et al. (2008) a aplicação de 50 μM de resveratrol repolarizou as células, parou a atividade elétrica e previniu a hipotonicidade induzida pela despolarização.

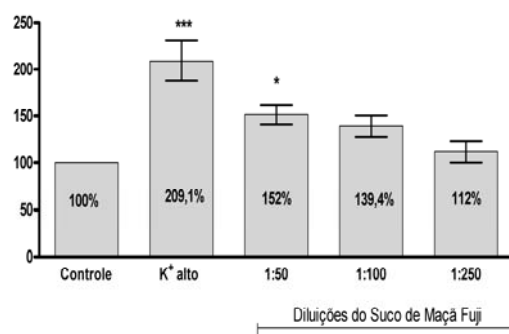
Entretanto, até o momento, não há dados publicados sobre o efeito de polifenóis da maçã na secreção de insulina tanto *in vitro* quanto *in vivo*. O presente estudo abre perspectivas para pesquisas posteriores que visem elucidar os efeitos da maçã na funcionalidade de células pancreáticas.



(A) Epicarpo– Maçã Fuji

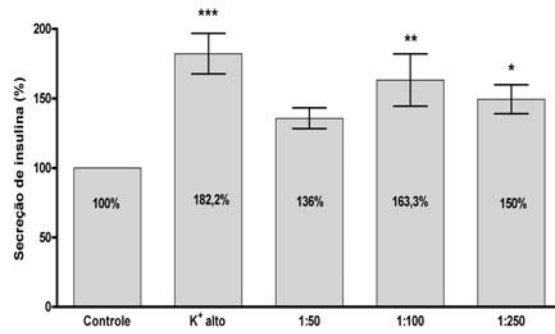


(B) Epicarpo – Maçã Gala



n >=7

(C) Suco – Maçã Fuji



n >= 7

(D) Suco – Maçã Gala

Figura 9. Efeito do extrato de epicarpo e suco de maçã Gala e Fuji na secreção de insulina. Células RINm5f (2×10^5 células/mL) foram cultivadas por 48 horas a 37°C e 5 % de CO₂ em meio RPMI 1640 suplementado com 10 % de soro fetal bovino e diluições variáveis do extrato de epicarpo (10, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou suco (1:50, 1:100 e 1:250). Após o cultivo, a secreção de insulina foi determinada pelo método do radioimunoensaio. Os resultados obtidos são expressos como média \pm erro padrão da média de dois experimentos independentes ($n \geq 7$). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ quando comparado com grupo controle e controle EX.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A Tabela 7 resume os resultados da pesquisa.

Tabela 7. Resumo dos resultados da pesquisa.

Parâmetro pesquisado	Fração testada			
	Epicarpo		Suco	
	Gala	Fuji	Gala	Fuji
<i>Maior atividade antioxidante</i>		X	X	
<i>Efeito citotóxico na ausência de estresse</i>		X (↑10 µg/mL)		X (1:10)
<i>Efeito citotóxico sob estresse por GA</i>				X (1:50)
<i>Efeito citotóxico sob estresse por peróxido</i>		X (10 µg/mL)		
<i>Efeito citoprotetor sob estresse por GA</i>	X (↑10 µg/mL)		X (todos)	X (1:250)
<i>Efeito citoprotetor sob estresse por peróxido</i>			X (1:50 e 1:100)	X (1:50 e 1:100)
<i>Efeito na secreção de insulina</i>			X (1:100 e 1:250)	X (1:50)

A partir desses resultados verifica-se a necessidade de estudos *in vivo* que comprovem os efeitos benéficos demonstrados na pesquisa para o suco de maçã na presença de estresse oxidativo, assim como o possível efeito do epicarpo de maçã que por diminuir a viabilidade celular pode ser aplicado em estudos com células tumorais.

A fração do epicarpo de maçã Fuji isolada pode apresentar potencial nutracêutico, entretanto, com aplicação recomendável em pesquisas na área de oncologia quando testada em alta concentração. Em doses baixas essa fração pode ser promissora em pesquisas que busquem o efeito *anti-aging* por não apresentar potencial citotóxico em situações onde o estresse não é gerado por GA e peróxido. Atletas, sem morbidades poderiam ser beneficiados pelo efeito do epicarpo de maçã Gala em baixas concentrações.

O suco de maçã Gala destaca-se como um alimento que merece maior investigação na aplicação como alimento funcional de propriedade antioxidante em doenças que geram estresse oxidativo. Devido o modelo de estresse induzido por GA ser mais fisiológico quando comparado ao modelo de estresse induzido por peróxido, pesquisas *in vivo* poderiam ser delineadas com o objetivo de verificar a capacidade antioxidante do suco da maçã Gala em indivíduos susceptíveis a esse tipo de estresse, como por exemplo os portadores de diabetes.

Esses resultados sugerem que avaliar a biodisponibilidade destes *in vivo* é essencial a fim de individualizar doses de acordo com a origem do estresse gerado. Situações patológicas diferentes ocasionam diferentes tipos de estresse (lipídico/protéico), conseqüentemente demandam diferentes necessidades de tipos e doses de antioxidantes que devem ser avaliadas individualmente.

7 CONCLUSÕES

O extrato de epicarpo de maçã Fuji e suco de maçã Gala foram as frações da fruta que apresentaram maior atividade antioxidante.

Na ausência de estresse, foram citotóxicos o extrato de epicarpo de maçã Fuji em concentrações acima de 10 µg/mL e o suco de maçã Fuji na diluição 1:10. Na presença de estresse induzido por GA a menor diluição do suco de maçã Fuji (1:50) apresentou efeito citotóxico.

Sob estresse induzido por glicose alta reverteram parcialmente o efeito desse o extrato de epicarpo de maçã Gala na concentração de 10 µg/mL assim como o suco mais diluído da maçã Fuji (1:250) e todas as diluições do suco de maçã Gala.

Extrato de epicarpo de maçã Gala apresentou menor produção intracelular de superóxido sendo esse efeito dose-dependente (100>50>10) O suco da maçã Fuji mais diluído (1:250) apresentou a melhor resposta citoprotetora e esse efeito pode estar relacionado (ao menos em parte) com a redução da produção de superóxido verificada para essa diluição de suco.

Quando comparados ao grupo de células incubadas na presença de peróxido de hidrogênio o suco de maçã Gala e Fuji na diluição de 1:100 apesar de não reverter totalmente o estresse gerado, mantiveram mais células viáveis. Suco de maçã Gala em 1:50 recuperou a viabilidade diante do estresse gerado uma vez que esse grupo não é diferente estatisticamente do grupo controle (100 % de viabilidade).

Suco de maçã Fuji na diluição de 1:50 e Suco de maçã Gala nas diluições de 1:100 e 1:250 aumentaram em média 50% a secreção de insulina nas células RINm5f.

REFERÊNCIAS

ABPM. Dados estatísticos sobre a produção mundial de maçã no ano de 2006. Disponível em <<http://www.abpm.org.br/>> Acesso em 20/08/2007.

ACWORTH, I.N.; OXON, P; PHIL, D. **The handbook of Redox Biochemistry**. Chelmsford: ESA, 2003

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resoluções de 16 a 19 de abril de 1999.

AL-AWWADI, N.A.; BORNET, A.; AZAY, J.; ARAIZ, C.; DELBOSC, S.; CRISTOL, J.P.; LINCK, N.; CROS, G.; TEISSEDE, P.L. Red wine polyphenols alone or in association with ethanol prevent hypertension, cardiac hypertrophy, and production of reactive oxygen species in the insulin-resistant fructose-fed rat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**; v. 52, n. 18, p. 5593-5597, set. 2004.

ANDERSON, R.A. Chromium and polyphenols from cinnamon improve insulin sensitivity. **Proceedings of the Nutrition Society**; v.67, n.1, p. 48-53, fev. 2008.

ANDREOZZI, F.; D'ALESSANDRIS, C.; FEDERICI, M.; LARATTA, E.; DEL GUERRA, S.; DEL PRATO, S.; MARCHETTI, P.; LAURO, R., PERTICONE, F.; SESTI, G. Activation of the hexosamine pathway leads to phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on Ser307 and Ser612 and impairs the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin insulin biosynthetic pathway in RIN pancreatic beta-cells. **Endocrinology**, v. 145, n.6 , p. 2845-57, jun. 2004.

ASHCROFT, F.M.P., RORSMAN. ATP-sensitive K⁺ channels: a link between Bcell metabolism and insulin secretion. **Biochemistry Society Trans**, n.18, v.1, p. 109-111,1990.

AWAD, M.A., DE JAGER, A., VAN WESTING, L.M. Flavonoid and chlorogenic acid levels in apple fruit: characterisation of variation. **Science Horticultural**, v. 83, p.249-263, 2000.

BABU, P.V.A.; SABITHA, K.E.; SHYAMALADEVI, C.S. Green tea impedes dyslipidemia, lipid peroxidation, protein glycation and ameliorates Ca²⁺-ATPase and Na⁺/K⁺-ATPase activity in the heart of streptozotocin-diabetic rats. **Chemical Biology Interaction**, v.162, n.2, p.157-64, 2006.

BARREIROS, R. C.; BOSSOLAN, G.; TRINDADE, C. E. P. Frutose em humanos: efeitos metabólicos, utilização clínica e erros inatos associados. **Revista de Nutrição**, v.18, n.3, p.377-389, 2005.

BENGMARK, S. Advanced Glycation and Lipoxidation End Products—Amplifiers of Inflammation: The Role of Food. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 31, n. 5, p.430-440, 2007.

BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p.70-76,1996.

BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J. Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of the total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. **Methods in Enzymology**, v. 299, p.15-27, 1999.

BEVERIDGE, F. M.; HARRISON, J. E. Nonenzymatic browning in pear juice concentrate at elevated temperatures. **Journal of Food Science**, v. 49, p. 1335-1340, 1984.

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev. Nutrição Campinas**, v. 12, n. 2, p. 123-130, mai./ago., 1999.

BLOCK, G.; PATTERSON, B.; SUBAR, A. Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. **Nutrition Cancer**, v.18, p. 1-29, 1992.

BOBE, L. B. SANSBURY, P. S. ALBERT, A. J. CROSS, L. KAHLE, J. ASHBY, M. SLATTERY, L.; CAAN, B.; PASKETT, E.; IBER, F. et al. Dietary Flavonoids and Colorectal Adenoma Recurrence in the Polyp Prevention Trial. **Cancer Epidemiology Biomarkers e Prevention**, v.17, n.6, p. 1344-1353, jun. 2008.

BOYER, J.; LIU, R.H.; Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutrition Journal*, v.3, 2004. Disponível em< <http://www.nutritionj.com/content/3/1/5>> Acesso em 24/06/2007.

CANCALO, P.F. The in vitro chemical estimation of fruit-juice antioxidant potentials may not reflect the in vivo beneficial effects of phytochemicals. **Fruit Processing**, p. 74-79, mar./abr. 2007.

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

CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R. L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. **Free Radical Biology Medicine**, v. 22, p.749-760, 1997.

CHANG, S.; TAN, C.; FRANKEL, E.N.; BARRETT, D.M. Low-density lipoprotein antioxidant activity of phenolic compounds and polyphenol oxidase activity in selected Clingstone peach cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.147-151, 2000.

CHAUBE, S. K.; PRASAD, P. V.; THAKUR, S. C.; SHRIVASTAV, T. G. Hydrogen peroxide modulates meiotic cell cycle and induces morphological features characteristic of apoptosis in rat oocytes cultured in vitro. **Apoptosis**, v. 10, n.4, p. 863-874, 2005.

CHI, TZONG-CHERNG; CHEN, WIN-PIN, CHI, TSUNG-LI; KUO, TZONG-FUO; LEE, SHOEI-SHENG; CHENG, JUEI-TANG; SU, MING-JAI. Phosphatidylinositol-3-kinase is involved in the anthyperglycemic effect induced by resveratrol in streptozotocin-induced diabetic rats. **Life Sciences**, v.80, p.1713-1720, 2007.

CHINNICI, F.; BENDINI, A.; GAIANI, A.; RIPONI, C. Radical Scavenging Activities of Peels and Pulpes from cv. Golden Delicious Apples as Related to Their Phenolic Composition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n.15; p. 4684-4689, 2004.

CZELUSNIAK, C.; OLIVEIRA, M.C.S.; NOGUEIRA, A.; SILVA, N.C.C.; WOSIACKI, G. Qualidade de maçãs comerciais produzidas no Brasil. Aspectos físico-químicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 6, p.25-31, 2003.

CROFT, K.D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Annals of New York Academic of Science.*, v.854, p.435-442, 1998.

CURTI, F.; SALGADO, J. M. Maçã: A fruta vermelha que cuida de nosso sangue. *Nutrição em Pauta*, **Nutrição Saude & Performance**, v. 26, n. 26, p. 6-11, 2005.

D'ALESSANDRIS, C.; ANDREOZZI, F.; FEDERICI, M.; CARDELLINI, M.; BRUNETTI, A.; RANALLI, M.; DEL GUERRA, S.; LAURO, D.; DEL PRATO, S.; MARCHETTI, P.; LAURO, R.; SESTI, G. Increased O-glycosylation of insulin signaling proteins results in their impaired activation and enhanced susceptibility to apoptosis in pancreatic beta-cells. **FASEB Journal Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v.18, n. 9, p.959-61, jun. 2004.

DIETRICH, H. Farb- und Gerbstoffe der Fruchtsäfte im Spannungsfeld verfahrenstechnischer und gesundheitlicher Aspekte. **Flüssiges Obst**, Schönborn, v. 64, n. 11, p. 631-637, 1997.

DA SILVA, P. P.; LARANJINHA, J.; DE FREITAS, V: Antioxidant protection of low density lipoprotein by procyanidins: structure/activity relationships. **Biochemistry Pharmacology**, v.66, p. 947-954, 2003.

DEVASAGAYAM, T.P.A. Free radical and antioxidants in human health: current status and future prospects. **Journal of the Association of Physicians of India**, v. 52, p. 794-804, out. 2004.

DONATH, M. Y.; GROSS, D. J.; CERASI, E.; KAISER, N. Hyperglycemia-Induced -Cell Apoptosis in Pancreatic Islets of *Psammomys obesus* during development of diabetes. **Diabetes**, v.48, p.738-744, abr. 1999.

DONATH, M.Y.; A., J. E.; MAEDLER, K.; SCHUMANN, D. M; ELLINGSGAARD, H.; EPPLER, E.; REINECKE, M. Mechanisms of β -Cell Death in Type 2 Diabetes. **Diabetes**, v. 54, p. S108-S113, 2005.

EBELER, S.E.; BRENNEMAN, C.A.; KIM, G.S.; JEWELL, W.T.; WEBB, M.R.; CHACON-RODRIGUEZ, L.; MACDONAOLD, E.A.; CRAMER, A.C.; LEVI, A., EBELER, J.D., ISLAS-TREJO, A., KRAUS, A., HINRICHS, S.H.; CLIFFORD, A.J: Dietary catechin delays tumor onset in a transgenic mouse model. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 76, p. 865-872, 2002.

ERENEL, G., ERBAS, D., ARICIOGLU, A. Free radicals and antioxidant systems. **Materia Medica Polona**, Warsaw, v.1, n.85, p.37-43, 1993.

ESCARPA, A.; GONZALEZ, M: High-performance liquid chromatography with diode-array detection for the performance of phenolic compounds in peel and pulp from different apple varieties. **Journal Chromatography Analysis**, v. 823, p. 331-337, 1998.

ESTEVEZ, M.; ESQUET, C.; GASPAR, A.; RIO, SOUSA, J. B.; REIS, S. ; MARQUES, M. P. M.; BORGES, F. Antioxidant Versus Cytotoxic Properties of Hydroxycinnamic Acid

Derivatives - A New Paradigm in Phenolic Research. **Archiv der Pharmazie**, v. 341, n. 3 , p. 164 – 173, 2008.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, n.1, p.61-68, 1997.

FEREIDOON, S.; MIRIAN, N. **Phenolics in food and nutraceuticals**. CRC Press: Florida, 2002.

FLEURIET, A.; MACHEIX, J-J. Phenolic Acids in Fruits and Vegetables. In: Rice-Evans, Catherine; Packer, Lester. **Flavonoids in Health and Disease**. Marcel Dekker, Inc. 2003. p. 1-42.

FORMICA, J. V.; REGELSON, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. **Food Chemical Toxicology**, v.33, p.1061-1080, 1995.

FULGONI, V.; FULGONI, S.; HAAGA, S.; EBERT, A. Apple consumption is associated with increased nutrient intakes and reduced risk of metabolic syndrome in adults from the National health and Nutrition Examination Survey (1999-2004). **Experimental Biology**, 2008 Poster Presentation (*unpublished*).

GIADA, M. de L. R.; MANCINI-FILHO, J. **Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* de compostos fenólicos de alimentos**. *Nutrire* v.28, p.91-107, 2004. Disponível em: <http://www.sban.com.br/educacao/nutrire/28/nut28_8.htm>. Acesso em 15/12/2008.

GHEYAS, F.; BLANKENSHIP, S. M.; YOUNG, E.; MCFEETERS, R. Dietary fibre content of thirteen apple cultivars. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 75 n. 3, p. 333 – 340,1999.

GOLDING, J.B.; MC, GLASSON; W.B.; WYLLIE, S.G.; LEACH,D.N. Fate of apple peel phenolics during cold storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p.2283-2289, 2001.

GORINSTEIN, S.; CASPI, A.; LIBMAN, I.; KATRICH, E.; LERNER, H.T.; TRAKHTENBERG, S. Fresh Israeli jaffa Sweetie juice consumption improves lipid metabolism and increases antioxidant capacity in hypercholesterolemic patients suffering from coronary artery disease: Studies in vitro and in humans and positive changes in albumin and fibrinogen fractions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 16, p. 5215-5222, 2004.

GRANKVIST, K.; MARKLUND, S.; TALJEDAL I. B. Cu-Zn superoxide dismutase , Mn-superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in pancreatic islets and other tissues in the mouse. **Biochemistry Journal**, v. 199, p. 393-398, 1981.

GRAZIANI, G; D'ARGENIO, G.; TUCILLO, C.; LOGUERCIO, C.; RITIENI, A.; MORISCO, F.; DEL VECCHIO BLAMCO, C.; FAGLIANO, V.; ROMANO, M. Apple polyphenol extracts prevent damage to human gastric epithelial cells in vitro and to rat gastric mucosa in vivo. **Gut**, v. 54, p. 193–200, 2005.

GIUNTINI, E.B.; RATTO, A.T; LAJOLO, F.M.; MENEZES, E.W. Tabela brasileira de composição de alimentos: TBCA-USP versão 2003. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v.39, n.3, p. 137-140, 2003.

GUYOT, S.; DRILLEAU, J.-F.; DOCO, T.; SOUQUET, J.-M.; MOUTOUNET, M. Characterization of highly polymerized procyanidins in cider apple (*Malus sylvestris* var. Kermerrien) skin and pulp. **Phytochemistry**, v. 44, n. 2, 1997, p. 351-357.

GUYOT, S.; MARNET, N.; SANONER, P.; DRILLEAU, J.-F.; LARABA, D. Reversed-Phase HPLC following Thiolytic for Quantitative Estimation and Characterization of the Four Main Classes of Phenolic Compounds in Different Tissue Zones of a French Cider Apple Variety (*Malus domestica* Var. Kermerrien). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 5, p. 1698-1705, 1998.

HASLER, C.M. A new look at an ancient concept. **Chemical Industry**, v. 2, p. 84-89, 1998.

HALLIWELL, B.; MURCIA, M.A.; CHIRICO, S.; ARUOMA, O.I. Free radicals and antioxidants in food and *in vivo*: what they do and how they work. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.35, n.1/2, p.7-20, 1995.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3. ed. Oxford : Clarendon Press, 1999.

HAN, X.; SHEN, T.; LOU, H. Dietary Polyphenols and Their Biological Significance. International. **Journal of Molecular Sciences**, v.8, p.950-988, 2007.

HANAMURA, T.; HAGIWARA, T.; KAWAGISHI, H. Structural and functional characterization of polyphenols isolated from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruit. **Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry**; n. 69, v.2, p.:280-286, fev. 2005.

HAREL, S.; KANNER, J. Hemoglobin and myoglobin as inhibitors of hydroxyl radical generation in a model system of "iron redox" cycle. **Free Radical Research**, v.6, p. 01-10, 1989.

HE, X.; LIU, R.H. Triterpenoids Isolated from Apple Peels Have Potent Antiproliferative Activity and May Be Partially Responsible for Apple's Anticancer Activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n.11, p. 4366–4370, 2007.

HEYLAND, D.K.; DHALIWA, R.; SUCHNER, U.; BERGER, M.M. Antioxidant nutrients: a systematic review of trace elements and vitamins in the critically ill patient. **Intensive Care Medicine**; v.31: p.327-337, 2005

HODNICK, W. F.; KALYANARAMAN, B.; PRITSOS, C. A.; PARDINI, R.S. The production of hydroxyl and semiquinone free radicals during the autoxidation of redox active flavonoids. Basic Life Sci. 1988, 49, 149-152. **Science**, v.49, p.149-152, 1988.

HOU, Z.Q.; LI, H.L.; ZHAO, J.J.; LI, G.W. Impairment of pancreatic islet beta cell function induced by intermittent high glucose through oxidative and endoplasmic reticulum stress: experiment with rat pancreatic islet beta cells. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi**, v. 88, n. 28, p. 2002-2004, 2008.

HRIBAL, M.L.; PEREGO, L.; LOVARI, S.; ANDREOZZI, F.; MENGHINI, R.; PEREGO, C.; FINZI, G.; USELLINI, L.; PLACIDI, C.; CAPELLA, C.; GUZZI, V.; LAURO, D.; BERTUZZI, F.; DAVALLI, A.; POZZA, G.; PONTIROLI, A.; FEDERICI, M.; LAURO, R.; BRUNETTI, A.; FOLLI, F.; SESTI, G. Chronic hyperglycemia impairs insulin secretion by affecting insulin receptor expression, splicing, and signaling in RIN beta cell line and human islets of Langerhans. **FASEB J** (The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology), v.17, ed 10 p. 1340-1342, jul. 2003.

HUBBARD, G.; WOLFFRAM, S.; LOVEGROVE, J.; GIBBINS, J. The role of polyphenolic compounds in the diet as inhibitors of platelet function. **Proceedings of Nutrition Society**, v. 62, p.469-478, 2003.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.1841-1856, 2005.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind dietary antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 3, n.6, p.1841-1856, 2005.

IHARA, Y.; TOYOKUNI, S.; UCHIDA, K.; ODAKA, H.; TANAKA, T.; IKEDA, H. Hyperglycemia causes oxidative stress in pancreatic beta-cells of GK rats, a model of type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 48, p. 927-932, 1999.

ISHIGE, K.; SCHUBERT, D.; SAGARA, Y. Flavonoids protect Neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 30, n. 5, p. 433-446, 2001.

ISHII M, SHIMIZU S, HARA Y, HAGIWARA T ,MIYAZAKI A, MORI Y, KIUCHI Y. Intracellular-produced hydroxyl radical mediates H₂O₂-induced Ca²⁺ influx and cell death in rat beta-cell line RIN-5F. **Cell Calcium**, v. 39, ed 6, p. 487-94, jun. 2006.

JALIL, A.M.; ISMAIL, A.; PEI, C.P.; HAMID, M.; KAMARUDDIN, S.H. Effects of cocoa extract on glucometabolism, oxidative stress, and antioxidant enzymes in obese-diabetic (Ob-db) rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**; v.56, n.17, p. 7877-7884, set. 2008.

JOHNSON, C. D.; EITENMILLER, R. R.; JONES, J. B.; RAS, V. N.; GEBHARDT, S. E. Composition of delicious apples. **Journal of Food Science**, n. 3, p. 952-953, 1984.

JULIEN, A.; TRIOLI, G.; DULAU, L. Maîtrise de la fermentation alcoolique: les facteurs de croissance de la levure et la prévention des arrêts. Partie 2 : Gestion de la fermentation alcoolique et prévention des arrêts de fermentation. **Revue des Enologues**, n.101, p. 25-29. 2001.

KAHLE, K.; KRAUS, M.; SCHEPPACH, W.; ACKERMANN, M.; RIDDER, F.; RICHLING, E. Studies on apple and blueberry fruit constituents: do the polyphenols reach the colon after ingestion? **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 50, n. 4-5, p. 418-423, abr. 2006.

KANETO, H.; KAJIMOTO, Y.; MIYAGAWA, J.; MATSUOKA, T.; FUJITANI, Y.; Umayahara, T.; MATSUZAWA, Y.; YAMASAKI, Y.; HORI, M. Beneficial effects of antioxidants in diabetes. Possible protection of pancreatic β -cells against glucose toxicity. **Diabetes**, v.48, p. 2398–2406, 1999.

KIM, E.K., KWON, K.B., SONG, M.Y., HAN, M.J., LEE, J.H., LEE, Y.R., LEE, J.H., RYU, D.G., PARK, B.H., PARK, J.W. Flavonoids protect against cytokine-induced pancreatic beta-cell damage through suppression of nuclear factor kappaB activation. **Pancreas**, v.35, n.4, p. e1-9, nov. 2007.

KIM, K.; KIM, H.Y. Korean red ginseng stimulates insulin release from isolated rat pancreatic islets. **Journal of Ethnopharmacology**; v.120, n.2, p.190-195, nov. 2008.

KNEKT, P; KUMPULAINEN, J; JARVINEN, R; RISSANEN, H; HELIOVAARA, M; REUNANEN, A; HAKULINEN, T; AROMA, A. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.76, p.560-568, 2002.

KO, S.H.; CHOI,S.W.; YE,S.K.; CHO,B.L.; KIM,H.S.; CHUNG,M.H. Comparison of the antioxidant activities of nine different fruits in human plasma. **Journal of Medicinal Food**; v.8, n.1, p.41-46, 2005.

KRIPPEIT-DREWS, P.; KRAMER, C.; WELKER, S.; LANG, F.; AMMON, H.P.; DREWS, G. Interference of H₂O₂ with stimulus-secretion coupling in mouse pancreatic β -cells. **Journal of Physiology**, v. 514, p.471-481, 1999.

KUSKOSKI, E.; ASUERO, M.; AGUSTÍN, G.; TRONCOSO, A.M. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar a actividad antioxidante em pulpa de frutos . **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.25, n.4, p. 726-732, out.-dez. 2005.

LAMSON D, BRIGNALL M. Antioxidants and Cancer III: Quercetin. **Alternative Medicine Review**, v.5, p.196-209, 2000.

LAPIDOT, T.; WALKER, M. D.; KANNER, J. Antioxidant and Prooxidant Effects of Phenolics on Pancreatic. **Cells in Vitro**. v. 50, n. 25, p. 7220-7225, 2002.

LAPIERRE, C.; POLLET, B.; NEGREL, J. The phenolic domain of potato suberin: structural comparison with lignins. **Phytochemistry**; v.42, p. 949–953, 1996.

LAYCHOCK, S.G. Rat Pancreatic Islet and RINm5F Cell Responses to Epiandrosterone, Dehydroepiandrosterone and Interleukin-1b. **Biochemical Pharmacology**, vol. 55, p. 1453-1464, 1998.

LEE, A.Y.; CHUNG, S.S. Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. **FASEB Journal**, v.13, p.23-30, 1999.

LEE, K.W.; LEE, S.J.; KANG, NJ; LEE, CY; LEE, HJ. Effects of phenolics in Empire apples on hydrogen peroxide-induced inhibition of gap-junctional intercellular communication. **Biofactors**, v. 21, n.1, p.361-365, 2004.

LEE, C. Y.; SMITH, N. L. Apples: An Important Source of Antioxidants in the American Diet. **New York Fruit Quarterly**, v.8, n.2, p.15-17, 2000.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 1995.

LEONTOVICZ, M.; GORINSTEIN, S.; LEONTOVICZ, H. Et al. Apple and pear peel pulp and their influence on plasma lipids and antioxidant potentials in rats fed cholesterol-containing diets. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, n. 19, p. 5780-5785, 2003.

LENZEN, S.; DRINKGERN, J.; TIEDGE, M. Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. **Free Radical Biology Medicine**, v. 3, p. 463-466, 1996.

LIU, H.R. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 78, n. 3, p. 517S-520S, set. 2003.

LUNCEFORD, N.; GUGLIUCCI, A. Ilex paraguariensis extracts inhibit AGE formation more efficiently than green tea. **Fitoterapia**; v.76, n.5, p.419-427, 2005.

MACHEIX J.J.; FLEURIET, A.; BILLOT, J. **Fruit phenolics**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1990. p. 25-32.

MACHLIN, L.J.; BENDICH, A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. **FASEB Journal**, v.1, n.6, p.441-445, 1987.

MANGAS, J. J.; SUAREZ, B.; PICINELLI, A.; MORENO, J.; BLANCO, D. Differentiation by Phenolic Profile of Apple Juices Prepared According to Two Membrane Techniques. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n.12, p.4777-4784, 1997.

MARTINS, A.K.A.; BOAVENTURA, M.F.C.; LIMA, M.M.R. Cultivo de linhagens permanentes. Em: PERES, C.M.; CURI, R. **Como cultivar células**. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2005. p. 41-49.

MCGHIE, T.K.; HUNT, M.; BARNETT, L. E. Cultivar and growing region determine the antioxidant polyphenolic concentration and composition of apples grown in New Zealand. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 8, p. 3065-3070, 2005.

MARES-GUIA, T.R.; MARIANI, D.B.; SANTOS, E.O.; CAMPOS, A.C.V.; GRAZIOLI, G.; SOGAYAR, M.C. **Effects of vitamin e and proinsulin c-peptide on hydrogen peroxide-induced cytotoxicity in rnm5f insulinoma cells and rat pancreatic islets**. In: IUBMB - INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY CONFERENCE, 10, 2007, Salvador, BA, Brasil.

MAYR, U.; TREUTTER, D.; SANTOS-BUELGA, C.; BAUER, H.; FEUCHT, W. Developmental changes in the phenol concentrations of “Golden delicious” apple fruits and leaves. **Phytochemistry**, v. 38, p. 1151-1155, 1995.

MELLO, M.R.L. de. Produção e mercado brasileiro de maçã. Disponível em : <<http://cnpuv.embrapa.br>>. Acesso em: 03/07/2007.

MILARDOVICA, S.; KEREKOVIĆA, I.; RUMENJAKB, V. A flow injection biamperometric method for determination of total antioxidant capacity of alcoholic beverages using bienzymatically produced ABTS+. **Food Chemistry**, v. 105, n. 4, p. 1688-1694, 2007.

MORAN, L.K.; GUTTERIDGE, J.M.C.; QUINLAN, G.J. Thiols in cellular redox signalling and

control. **Current Medicinal Chemistry**, v. 8, p.763-772, 2001.

MORGADO, C.M.A.; DURIGAN, J.F.; SANTOS, L.O. Avaliação da atividade antioxidante em frutos de goiaba “de vez” e maduros. In: XX Congresso Brasileiro de Fruticultura, 2008, Centro de Convenções – Vitória/ES. **Anais eletrônicos**. Vitória: 2008. Disponível em: <http://www.200.137.78.15/cd_XXCBF/paginas/FisiologiaPos_Colheita/20080716_154901.pdf> .>

MORGAN, C. R.; LAZAROW, A. Immunoassay of insulin: two antibodies system: plasma insulin levels of normal, subdiabetic and diabetic rats. **Diabetes**, v.12, p.115-121, 1963.

MOYER, R.A.; HUMMER, K.E.; FINN, C.E.; FREI, B.; WROSTAD, R.E. Anthocyanins, Phenolics, and Antioxidant Capacity in Diverse Small Fruits: Vaccinium, Rubus, and Ribes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.519-525, 2002.

MUSTATA, G.T.; ROSCA, M.; BIEMEL, K.M.; REIHL, O.; SMITH, M.A.; VISWANATHAN, A. Paradoxical effects of green tea (*camellia sinensis*) and antioxidant vitamins in diabetic rats. **Diabetes**, v. 54, n.2, p.517-26,2005.

NAKAZAKI, M.; KAKEI, M.;KORIYAMA, N.; TANAKA, H. Involvement of ATP-sensitive K⁺ channels in free radical- mediated inhibition of insulin secretion in rat pancreatic B-cell. **Diabetes**, v. 44, p. 878-883, 1995.

NAKASAKI, M.; KAKEI, M.;YEKURA, K.; KORIYAMA, N.; MORIMITSU, S.; ICHINARI, K.; YADA, T. ; TEI, C. Diverse effects of hydrogen peroxide on cytosolic Ca²⁺ homeostasis in rat pancreatic B-cells. **Cell Structure and Function**, v. 25, p.187-193, 2000.

NAMIKI, M. Antioxidants/antimutagens in food. **Journal of Nutrition**, Boca Raton, v.29, n.4, p.273-300, 1990.

NARDINI, M.; PISU, P.; GENTILI, V.; NATELLA, F.; DI FELICE, M; PICCOLELLA, E.; SCACCINI, C. Effect of caffeic acid on tert- butyl hydroperoxid-induced oxidative stress in U937. **Free Radical Biology Medicine**, v.25, p.1098-1105, 1998.

NAWAR, W.W. Lipids. In: FENNEMA, O.R. (Ed.). **Food Chemistry**. 2.ed. New York : Marcel Dekker, 1985. p.139-244.

NEGRE-SALVAYRE, R. Quercetin prevents the cytotoxicity of oxidized LDL on lymphoid cell lines. **Free Radical Biology Medicine**, v.12, p.101-106, 1992.

NELSON, N. A fotometric adaptation of Somogyi method for the determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, v.153, p.375-380, 1944.

NELSON, J.L. et al. Dietary Modification and Moderate Antioxidant Supplementation Differentially Affect Serum Carotenoids, Antioxidant Levels and Markers of Oxidative Stress in Older Humans. **Journal of Nutrition**, v. 133, n. 10, p. 3117-3123, 2003.

NICOLAS, J.J.; RICHARD-FORGET, F.C.; GOUPY, P.M.; AMIOT, M.J., Enzymatic browning reactions in apple and apple products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 34, n. 2, p. 109-157, 1994.

NOGUEIRA, A.; SANTOS, L. D.; WIECHETCK, F. V. B.; GUYOT, S.; WOSIACKI, G. Efeito do processamento no teor de compostos fenólicos em suco de maçã. **Publicatio UEPG – Ciências Exatas e da Terra**, Ponta Grossa, v.9, n.3, p.7-14, dez. 2003.

NOGUEIRA, A. **Tecnologia de processamento sidrícola: efeitos do oxigênio e do nitrogênio na fermentação lenta da sidra**. 2003. 210 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos Agroindustriais)- Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.

NOGUEIRA, A.; SANTOS, L. D.; WIECHETCK, F. V. B.; GUYOT, S.; WOSIACKI, G. Efeito do processamento no teor de compostos fenólicos em suco de maçã. **Publicatio UEPG – Ciências Exatas e da Terra**, Ponta Grossa, v.9, n.3, p.7-14, dez. 2003.

NOGUEIRA, A.; TEIXEIRA, S. H., DEMIATE, I. M.; WOSIACKI, G. Influência do processamento no teor de minerais em sucos de maçãs. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, vol.27, n.2, p.259-264, abr./jun. 2007.

NÖTHLINGS, U., MURPHY, S. P.; WILKENS, L. R.; HANKIN, J. H.; KOLONEL, L. N. Flavonols and Pancreatic Cancer Risk: The Multiethnic Cohort Study. **American Journal of Epidemiology**, v. 166, n.8, p.924-31, 2007.

OLSSON, M. E.; GUSTAVSSON, K.E.; ANDERSSON, S.; NILSSON, A.; DUAN, R.D. Inhibition of cancer cell proliferation *in vitro* by fruit and berry extracts and correlations with antioxidant levels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 24, p. 7264-7271, 2004.

OLSZEWER, E.; NAVEIRA, M.; GARCIA, S. **Nutrição Ortomolecular**. São Paulo: Tecnopress, 1997. p. 17-71.

ORTIZ, D.; SHEA, T.B. Apple juice prevents oxidative stress induced by amyloid-beta in culture. **Journal of Alzheimer Disease**, v.6 p.27-30, 2004.

OUGH, C. S.; AMERINE, M. A. **Methods for analysis of musts and wines**. 2^aed. New York: John Wiley & Sons. 1988, p. 377.

OZYURT, D.; DEMIRATA, B.; APAK, R. Determination of total antioxidant capacity by a new spectrophotometric method based on Ce (IV) reducing capacity measurement. **Talanta**, v.71, n. 3, p. 1155-1165, Fev 2007.

PAGANINI, C.; NOGUEIRA, A.; DENARDI, F.; WOSIACKI, G. Industrial fitness analysis of six apple cultivars, considering their physico-chemical evaluation. **Ciências Agrotecnológicas**, Lavras, v. 28, n. 6, p.1336-1343, nov./dez. 2004.

PARI, L.; VENKATESWARAN, S. Effect of an aqueous extract of Phaseolus vulgaris on the properties of tail tendon collagen of rats with streptozotocin-induced diabetes. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.36, n. 7, p.861-870, 2003.

PASAOGLU, H.; SANCAK, B.; BUKAN, N. Lipid peroxidation and resistance to oxidation in patients type 2 Diabetes Mellitus. **Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v.203, p.211-218, 2004.

PASCHOAL, V. Alimentos para a Saúde. 2001, 48f. Monografia (VP Consultoria Nutricional). Sadia, São Paulo, 2001. Distribuição gratuita.

PRAZ, G.A.; HALBAN, P.A.; WOLLHEIM, C.B.; BLONDEL, B.; STRAUSS, A.J.; RENOLD, A.E. Regulation of immunoreactive-insulin release from a rat cell line (RINm5F). **Biochemistry Journal**, v.210, p. 345-352, 1983.

PRIOR, R.L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n.8, p.:3101-3113, 2005.

PEARSON, D.A.; TAN, C.H.; GERMAN, J.B.; DAVIS, P.A.; GERSHWIN, M.E. Apple juice inhibits human low density lipoprotein oxidation. **Life Sciences**, v. 64, n. 21, p. 1913-1920, 1999.

PENG, I; KUO, S. Flavonoid structure affects inhibition of lipid peroxidation in caco-2 intestinal cells at physiological conditions. **Journal of Nutrition**, v.342, n.5, p.2184-2187, 2003.

PEREZ, Y.Y.; JIMENEZ-FERRER, E.; ZAMILPA, A.; HERNANDEZ-VALENCIA, M.; ALARCON-AGUILAR, F.J.; TORTORIELLO, J.; ROMAN-RAMOS, R. Effect of a polyphenol-rich extract from Aloe vera gel on experimentally induced insulin resistance in mice. **American Journal of Chinese Medicine**; v.35, n.6, p.1037-1046, 2007.

PERSAUD, S.J.; AL-MAJED, H.; RAMAN, A.; JONES, P.M. Gymnema sylvestre stimulates insulin release in vitro by increased membrane permeability. **Journal of Endocrinology**; v.163, n.2, p. 207-212, nov. 1999.

PHILIPPI, S.T. Tabela de composição de alimentos: suporte para decisão nutricional . Brasília: ANVISA, FINATEC/NUT-Unb, 2001. p. 133.

PICK A.; CLARK, J.; KUBSTRUP, C.; LEVISETTI, M.; PUGH, W.; BONNER-WEIR, S.; POLONSKY, K.S. Role of apoptosis in failure of b-cell mass compensation for insulin resistance and b-Cell defects in the Male Zucker Diabetic fatty rat. **Diabetes**, v.47, p.358-364, mar., 1998.

POITOUT, V.; ROBERTSON, R.P. Minireview: Secondary beta-cell failure in type 2 diabetes-a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. **Endocrinology**; v. 143, p. 339-342, 2002.

PRAZ, G.A.; HALBAN, P.A.; WOLLHEIM, C.B.; BLONDEL, B.; STRAUSS, A.J.; RENOLD, A.E. Regulation of immunoreactive-insulin release from a rat cell line (RINm5F). **Biochemistry Journal**, v.210, p.345-352, 1983.

PROVASI, M.; OLIVEIRA, C. E. de; MARTINO, M. C.; PESSINI, L. G.; BAZOTTE, R. B.; CORTEZ, D. A. G. Avaliação da toxicidade e do potencial antihiperlipidêmico da Averrhoa carambola L. (Oxalidaceae). **Acta scientiarum**; v.23, n.3, p. 665-669, jun. 2001.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, n.8, p.3396-3402, 2000.

RAPISARDA, P.; CAROLLO, G.; FALLICO, B.; TOMASELLI, F.; MACCARONE, E. Hydroxycinnamic acids as markers of Italian blood orange juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**; v.46, p. 464–470. 1998.

RAPISARDA, P.; TOMAINO, A.; LO CASCIO, R.; BONINA, F.; DE PASQUALE, A.; SAIJA, A. Antioxidant effectiveness as influenced by phenolic content of fresh orange juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p.4718–4723, 1999.

RIBÉREAU-GAYON, P. *Les Composés Phénoliques des Végétaux*. Paris : Dunod, 1968. 254p.

RICE-EVANS, C. **Flavonoids in Health and Disease**, New York: Marcel. Dekker, 2003.

RICE-EVANS, C.; BURDON, R. Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. **Progress in Lipid Research**, Oxford, v.32, n.1, p.71-110, 1993.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

ROBERFROID, M.B. A European Consensus of Scientific Concepts of Functional Foods. *Nutrition*, v. 16, n. 1, p. 689-91, 2000.

ROBERFROID, M.B. What is Beneficial for Health? The Concept of Functional Food. *Food Chemical Toxicology*, v. 37, n. 1, p.1039-41, 1999.

ROBERTSON; R. P. Chronic Oxidative Stress as a central mechanism for glucose toxicity in Pancreatic Islet Beta Cells in Diabetes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 41, p. 42351- 42354, out. 2004.

PERES, C.M.; CURI, R. **Como cultivar células**. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2005.

SAIJA, A.; SCALESE, M.; LANZA, M.; MARZULLO, D.; BONINA, F.; CASTELLI, F. Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. **Free Radical Biology and Medicine**, v.19, p.4851-4861, 1995.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J.A.; SAURA-CALIXTO, F. New parameter for evaluation of free radical scavenging capacity of polyphenols. 2nd International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry (ECSOC-2), Disponível em: <<http://www.mdpi.org/ecsoc>>, p.1-30, Set 1998. Acesso em 14/02/2009.

SANTOS, H.S.; CRUZ, W.M.S. A terapia nutricional com vitaminas antioxidantes e o tratamento quimioterápico oncológico. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 47, n. 3, p. 303-308, 2001.

SANTOS, L.D.; PAGANINI, C.; NOGUEIRA, A.; WOSIACKI, G. Composição Química de Sucos Provenientes de Maçãs de Dez Diferentes Genótipos. Safra 2002/2003. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.8, n.2, p. 87-91, 2005.

SAWA, T.; NAKAO, M.; AKAIKE, T.; ONO, K.; MAEDA, H. Alkylperoxyl radical scavenging activity of various flavonoids and other phenolic compounds: implications for the anti-tumor

promoter effect of vegetables. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p.397-402, 1999.

SCHAEFER, S.; BAUM, M.; EISENBRAND, G.; DIETRICH, H.; WILL, F.; JANZOWSKI C. Polyphenolic apple juice extracts and their major constituents reduce oxidative damage in human colon cell lines. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 50, n 1, p. 24-33, 2006.

SCHRENZEL, J.; SERRANDER, L.; BANFI, B.; NUSSE, O.; FOUYOUZI, R., LEW, D. P.; DEMAUREX, N.; KRAUSE, K. H: Electron currents generated by the human phagocyte NADPH oxidase. **Nature**, v. 392, p. 734-737, 1998.

SHAHIDI, F., JANITHA, P.K., WANASUNDARA, P.D. Phenolic antioxidants. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v.32, n.1, p.67-103, 1992.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Phenolics in food and nutraceuticals**. Florida: CRC Press, 2004. p.92-123.

SHI, X.; SCHECLL, H.P.; SUMMERS, R.M.; LAMBERT, G.P.; CHANG, R.T.; XIA, T. Fructose transport mechanism in humans. **Gastroenterology**, v.113, n.4, p.1171-1179, 1997.

SILVA, P. P. da; LARANJINHA, J.; FREITAS, V. de. Antioxidant protection of low density lipoprotein by procyanidins: structure/activity relationships. **Biochemistry Pharmacology**, v. 66, p. 947-954, 2003.

SIMIC, M.G., JAVANOVIC, S.V. Inactivation of oxygen radicals by dietary phenolic compounds in anticarcinogenesis. In: HO, C.T., OSAWA, T., HUANG, T.M., ROSEN, R.T. (Ed.). **Food phytochemicals for cancer prevention**. Washington : American Chemical Society, 1994. (ACS Symposium Series, n.546). p.20-33.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolic with phosphomolibdic acid reagent. **American Journal of Enology and Viticulture**, n.16, p.144-158, 1965.

SONG, Y.; MANSON, J.E.; BURING, J.E.; SESSO, H.D.; LIU, S. Associations of dietary flavonoids with risk of Type 2 Diabetes, and markers of Insulin Resistance and Systemic Inflammation in Women: A Prospective Study and Cross Sectional Analysis. **Journal American College of Nutrition**, v.24, n.5, p.376-384, 2005.

SOMOGYI, M. A new reagent for determination of sugars. **Journal of Biological Chemistry**, v.160, p.61-68, 1945.

STEINMETZ, K.A.; POTTER, J.D. Vegetables, fruit and cancer II. Mechanisms. **Cancer Causes Control**, v.2, p. 427-442, 1991a.

STOTE, K.S.; BAER, D.J. Tea consumption may improve biomarkers of insulin sensitivity and risk factors for diabetes. **Journal of Nutrition**; v.138, n.8, p.1584S-1588S, ago 2008.

STROBEL, P.; ALLARD, C.; PEREZ-ACLE, T.; CALDERON, R.; ALDUNATE, R.; LEIGHTON, F. Myricetin, quercetin and catechin-gallate inhibit glucose uptake in isolated rat adipocytes. **Biochemistry Journal**; v.386, p. 471-478, mar. 2005.

SUGIHARA, N.; ARAKAWA, T.; OHNISHI, M.; FURUNO, K. Anti- and pro-oxidative effects of flavonoids on metal-induced lipid hydroperoxide-dependent lipid peroxidation in cultured hepatocytes loaded with alpha-linolenic acid. **Free Radical Biology and Medicine**, v.27, p.1313-1323, 1999.

SUZANNE, L. Rat Pancreatic Islet and RINm5F Cell Responses to Epiandrosterone, Dehydroepiandrosterone and Interleukin-1b. **Biochemical Pharmacology**, v. 55, p. 1453–1464, 1998.

TAJIRI, Y.; MOLLER, C.; GRILL, V. Long-term effects of aminoguanidine on insulin release and biosynthesis: evidence that the formation of advanced glycosylation end products inhibits B cell function. **Endocrinology**, v. 138, p. 273-280, 1997.

TALCOTT, S.T.; HOWARD, L.R. Phenolic autoxidation is responsible for color degradation in processed carrot puree. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, p.2109–2115, 1999.

TANAKA, Y.; GLEASON, C. T.; TRAN, P. O. T.; HARMON, J. S.; ROBERTSON, R. P. Prevention of glucose toxicity in HIT-T15 cells and Zucker diabetic fatty rats by antioxidants. **Proceedings of National Academy of Science**, v. 96, p. 10857-10862, 1999.

TANNER, H., BRUNNER, H.R. **Getränke Analytik - Untersuchungsmethode für die Labor- und Betriebspraxis**. Wädenswill, Verlag Helles, p. 206, 1985.

TIEDGE, M.; LORTZ, S.; DRINKGERN, J.; LENZEN, S. Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. **Diabetes**, v. 46, p. 1733-1742, 1997.

TOMAS-BARBERAN, F.A.; GIL, M.I.; CREMIN, P.; WATERHOUSE, A.L.; HESS-PIERCE, B.; KADER, A.A. HPLC-DAD-ESIMS analysis of phenolic compounds in nectarines, peaches, and plums. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, v. 49, p.4748–4760, 2001.

TSAO R, YANG R, YOUNG JC, ZHU H. Polyphenolic profiles in eight apple cultivars using high-performance liquid chromatography (HPLC). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n.21, p.6347-53, out. 2003.

UNIVERSIDADE DE SAO PAULO. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental. **Tabela brasileira de composição de alimentos**. Disponível em <<http://www.fcf.usp.br>>. Acesso em 29/09/2007.

VALEN, G.; SONDÉN, A.; VAAGE, J.; MALM, E.; KJELLSTRÖM, B.T. Hydrogen peroxide induces endothelial cell atypia and cytoskeleton depolymerization. **Free Radical Biology & Medicine**, n.26, v.11-12, p.1480-1888, jun.1999.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p.44-84, 2007.

VAN DER SLUIS, A.A.; DEKKER, M.; DE JAGER, A.; JONGEN, W.M.F. Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: effect of cultivar, harvest year, and storage conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 8, p. 3606-3613, ago. 2001.

VAN DER SLUIS, A.A., DEKKER, M., SKREDE, G., AND JONGEN, W.M.F. Activity and Concentration of Polyphenolic Antioxidants in Apple Juice. 1. Effect of Existing Production Methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n.25, p.7211 - 7219, 2002.

VAN DER SLUIS, A.A.; DEKKER, M.; VERKERK, R.; JONGEN, W. M. F. An improved, rapid *in vitro* method to measure antioxidant activity. Application on selected flavonoids and apple juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 9, p. 4116-4122, 2000.

VAN SUMERE, C. F. Phenols and phenolic acids. In: **Methods in Plant Biochemistry**. v. I. Plant Phenolics. Harbone, J. B. London: Academic Press, 1989, p.29.

VEERIA, S.; KAUTENBURGER, T.; HABERMANN, N.; SAUER, J.; DIETRICH, H.; WILL, F.; POOL-ZOBEL, B.L. Apple flavonoids inhibit growth of HT29 human colon cancer cells and modulate expression of genes involved in the biotransformation of xenobiotics. **Molecular Carcinology**; v.45, n.3, p.164-174, 2006.

VINSON, J.; SU, X.; ZUBIK, L.; BOSE, P. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, n.11, p.5315-5321, 2001.

XUE, M.; QIAN, Q.; ANTONYSUNIL, A.; RABBANI, N.; BABAEI-JADIDI, R., THORNALLEY, P. J. Activation of NF-E2-related factor-2 reverses biochemical dysfunction of endothelial cells induced by hyperglycemia linked to vascular disease. **Diabetes**, v.57, n.10, p. 2809-2817, out. 2008.

YOON, S. H.; HONG, M. S.; CHUNG, J. H.; CHUNG, S.H. Anti-Apoptotic Effect of Rheum undulatum Water Extract in Pancreatic β -cell Line, HIT-T15. **Korean Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 8, p.51-55, fev. 2004.

WANG,H.; CAO, G.; PRIOR, R.L. Total antioxidant capacity of fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.44, n.3, p.701-705, 1996.

WANG, Y.M.; VAN EYS, J. Nutritional significance of fructose and sugar alcohols. **Annual Review of Nutrition**, n. 1, p. 437-75, 1981.

WHO/FAO EXPERT CONSULTATION ON DIET, NUTRITION AND THE PREVENTION OF CHRONIC DISEASES. **Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: report of a joint WHO/FAO expert consultation**. WHO Technical Report Series 916. Geneva: WHO, 2003.

WOLFE, K.; WU, X.; LIU, R. H. Antioxidant Activity of Apple Peels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, n.3, p.609–614, 2003.

WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A. Suco de maçã. In: VENTURINI FILHO, W. G. **Tecnologia de Bebidas: matéria-prima, processamento, BPF/APPCC, Legislação e Mercado**. São Paulo: Edgard Blücher, 2005, p. 255-292.

WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A.; SILVA, N. C. C. Brazilian apple production: a few years later. **Fruit Processing**, Chicago, v. 12, p. 472-475, 2000.

WOSIACKI, G.; PHOLMAN, B. C.; NOGUEIRA, A. Características de qualidade de cultivares de maçã: avaliação físico-química e sensorial de quinze cultivares. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n.3, p.347-352, jul./set. 2004.

WOSIACKI, G.; SILVA, N.C.C.; NOGUEIRA, A.; DENARDI, F. The apple and its fructose content cultivar Sansa – A case study. **Publicatio UEPG Ciência exatas e da terra, ciências agrárias e engenharias**, Ponta Grossa, v.11, n.2, p. 27-39, ago. 2005.

WU, L.Y.; JUAN, C.C.; HO, L.T.; HSU, Y.P.; HWANG, L.S. Effect of green tea supplementation on insulin sensitivity in Sprague-Dawley rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**; v.52, n.3, p.643-648, fev. 2004.

ZHANG, H.; OLLINGER, K.; BRUNK, U. Insulinoma cells in culture show pronounced sensitivity to alloxan-induced oxidative stress. **Diabetologia**, v.38, p.635-641, 1995.