

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos



Tese de doutorado

Bioatividade de extratos fenólicos de maçã (*Malus domestica* Borkh cv. Gala)

Chirle de Oliveira Raphaelli

Nutricionista

Pelotas, 2019

Chirle de Oliveira Raphaelli

Bioatividade de extratos fenólicos de maçã (*Malus domestica* Borkh cv. Gala)

Tese apresentada à Universidade Federal de Pelotas em exigência do Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências e Tecnologia de Alimentos.

Comitê de orientação:
Prof. Dr. Leonardo Nora
Dr^a. Márcia Vizzotto
Profa. Dr^a. Elizandra Braganhol

Pelotas, 2019

R217b Raphaelli, Chirle de Oliveira

Bioatividade de extratos fenólicos de maçã (*Malus domestica* Borkh cv. Gala) / Chirle de Oliveira Raphaelli; Leonardo Nora, orientador ; Márcia Vizzotto, Elizandra Braganhol, coorientadoras. — Pelotas, 2019.

155 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. Maçã gala. 2. Extração por fase sólida. 3. Efeito antimicrobiano. 4. Alfa-glicosidase. 5. Melanoma. I. Nora, Leonardo, orient. II. Vizzotto, Márcia, coorient. III. Braganhol, Elizandra, coorient. IV. Título.

CDD : 664

Data da Defesa: 12/04/2019

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Leonardo Nora (Orientador) - *Ph.D. in Biological Sciences at the University of East Anglia - UK* (Orientador)

Dra. Márcia Vizzotto (Orientadora) - *Ph.D. in Horticultural Sciences at the Texas A&M University - USA* (Co-orientador)

Profa. Dra. Fabiana Kömmling Seixas - Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas (UFPel)

Prof. Dr. Fabrício da Fonseca Barbosa- Doutor em Engenharia Agrícola pela Universidade Federal de Viçosa (UFV)

Prof. Dra. Helayne Aparecida Maieves - Doutora em Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal do Paraná (UFPR)

Dedicatória

*Dedico a Deus, à minha filha Ana Luísa, ao meu
TRImarido Maurício e minha família pela força,
companheirismo e incentivo diários.*

Agradecimentos

Agradecendo a Deus, pela inspiração diária de vida e por me fazer seguir em frente.

Gratidão a todos da minha família, especialmente à minha mãe, que acreditou que um dia eu seria Doutora. Meu pai por não saber bem o que estava acontecendo, mas me incentivou sempre. Minhas irmãs por entenderem a ausência e meu irmão por auxiliar nas demandas de mãe.

Agradeço ao meu marido, pela enorme paciência e pelo companheirismo de sempre. Gratidão à minha filhota Ana Luísa por entender todas ausências neste período.

Agradeço aos meus orientadores, primeiro, ao Prof. Leonardo Nora pelo apoio, tolerância, paciência e orientação.

Agradeço à querida Márcia Vizzotto, por todos ensinamentos na área de alimentos.

Gratidão aos ensinamentos de meus colegas de laboratório e agora amigos: Priscila, Marina, Alex, Jardel, Maurício e Taiane. Minha colega e amiga Elisa, você foi essencial para o aprendizado durante este percurso.

Também agradeço imensamente à Juliana Vinholes e ao Gabriel Dalmazo pelo apoio e ajuda nas longas escritas dos artigos.

À Universidade Federal de Pelotas e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

À Embrapa Clima Temperado, pela disponibilização de sua estrutura, onde parte do meu trabalho de doutorado foi executado.

À CAPES pela concessão da bolsa de doutorado.

Por último, a todos que de certa forma estiveram comigo me apoiando e incentivando em todos os momentos, meu muito obrigada!

“Agradeço a todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. As críticas nos auxiliam muito.” (Francisco Cândido Xavier)

Resumo

RAPHAELLI, Chirle de Oliveira. **Bioatividade de extratos fenólicos de maçã (*Malus domestica* Borkh cv. Gala)**. 2019. 155f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019. Orientador: Prof. Dr. Leonardo Nora.

Introdução: O consumo de maçã, fruta rica em compostos fenólicos, é associado a diversos benefícios à saúde. Seus compostos bioativos estão relacionados à redução de glicemia em indivíduos diabéticos e a prevenção de diversos tipos de cânceres. Além de serem potenciais agentes antibacterianos. Material e métodos: Neste estudo, extratos acetoetanólicos de maçã cultivar Gala, colhidas em Vacaria, RS, Brasil, no ano de 2018, foram concentrados por extração em fase sólida para obtenção de um extrato purificado e quatro frações fenólicas. Para avaliar o potencial de utilização destes extratos; na alimentação, em cosméticos e medicamentos, os mesmos foram avaliados de diversas formas: (1) composição fenólica individual e total, (2) perfil fenólico, (3) termoestabilidade, (4) fotoestabilidade, (5) estabilidade a mudanças de pH, (6) atividade antioxidante, (7) atividade antimicrobiana frente à bactérias patogênicas, (8) atividade antidiabética, (9) potencial de prevenção de morte celular em fibroblastos e (10) potencial anticarcinogênico frente a células de melanoma (murino e humanas). Principais resultados: Foram obtidos um extrato purificado e quatro frações onde foram encontrados flavonoides e ácidos fenólicos. Dentre estes, foram identificadas 5 subclasses de compostos fenólicos entre ácidos hidrocínânicos, flavonols, flavanols, antocianina e dihidrochalcona. Frações III, IV e extrato purificado apresentaram compostos similares e elevada atividade antioxidante correlacionada ao conteúdo de fenólicos em cada uma. A estabilidade deles se manteve, especialmente entre os extratos na condição de armazenamento ótima. O extrato purificado foi capaz de reduzir até 34% a formação de danos ao material genético, ficando evidente a capacidade do produto reduzir a fragmentação do DNA induzida pela radiação ultravioleta em cultura de fibroblastos humanos, assim como, a fração II reduziu até 19%, a fração III reduziu 17 % e a IV 22 % de danos. Frações III e IV mostraram

atividade anticâncer para células de melanoma. A fração IV e o extrato purificado inibiram efetivamente o crescimento de bactérias gram-positivas (*Listeria monocytogenes* e *S. Aureus*). Especialmente o extrato purificado inibiu a ação da enzima α -glicosidase. Conclusões: Conclui-se que o extrato purificado e frações de maçã cv. gala podem ser mais estudados para uso de ingredientes ativos na proteção da pele contra o fotoenvelhecimento e câncer, sobre atividade antidiabética e também na preservação, sanidade e funcionalidade de alimentos.

Palavras-chave: maçã gala; extração por fase sólida; efeito antimicrobiano; alfa-glicosidase; melanoma.

Abstract

RAPHAELLI, Chirle de Oliveira. ***Bioactivity of phenolic extracts of apple (Malus domestica Borkh cv. Gala)***. 2019. 155f. Thesis (Doctorate in Food Science and Technology) - Postgraduate Program in Food Science and Technology, Department of Agroindustrial Science and Technology, Faculty of Agronomy Eliseu Maciel, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2019.

Introduction: The consumption of apple, fruit rich in phenolic compounds, is associated with several health benefits. Its bioactive compounds are related to the reduction of glycaemia in diabetic individuals and the prevention of several types of cancers. In addition to being potential antibacterial agents. Material and methods: In this study, acetoethanolic extracts of apple Gala cultivar, harvested in Vacaria, RS, Brazil, in the year 2018, were concentrated by extraction in solid phase to obtain a purified extract and four phenolic fractions. To evaluate the potential use of these extracts; (1) individual and total phenolic composition, (2) phenolic profile, (3) thermostability, (4) photostability, (5) stability at pH changes, (6) antioxidant activity, (7) antimicrobial activity against pathogenic bacteria, (8) antidiabetic activity, (9) potential for preventing cell death in fibroblasts and (10) anticarcinogenic potential against melanoma cells (murine and human). Main results: A purified extract and four fractions were obtained where flavonoids and phenolic acids were found. Among these, 5 subclasses of phenolic compounds among hydrocinnamic acids, flavonols, flavanols, anthocyanin and dihydrochalcone were identified. Fractions III, IV and purified extract showed similar compounds and high antioxidant activity correlated to phenolic content in each one. Their stability was maintained, especially among the extracts in the optimum storage condition. The purified extract was able to reduce damage to the genetic material by up to 34 %, with the ability of the product to reduce the fragmentation of DNA induced by ultraviolet radiation in human fibroblast culture, as well as fraction II reduced by up to 19% fraction III reduced 17 % and IV 22 % damage. Fractions III and IV showed anticancer activity for melanoma cells. Fraction IV and the purified extract effectively inhibited the growth of gram-positive bacteria (*Listeria monocytogenes* and *S. aureus*). Especially the purified extract inhibited the action of the α -glycosidase enzyme. Conclusions: It is concluded that the purified extract and apple fractions cv. gala can be further studied for use

of active ingredients in the protection of skin against photoaging and cancer, on antidiabetic activity and also in the preservation, sanity and functionality of foods.

Keywords: apple gala; solid phase extraction; antimicrobial effect; alpha-glucosidase; melanoma.

Lista de figuras

Figura 1. Psudofruto maçã cv. <i>Gala</i>	23
Figura 2. Metabolismo primário e secundário da maçã cv. <i>Gala</i>	24
Figura 3. Estrutura química básica do fenol	26
Figura 4. Classificação dos compostos fenólicos	27
Figura 5. Concentrações das moléculas de polifenóis na semente, casca e casca mais polpa	30
Figura 6. Estrutura química dos ácidos fenólicos	31
Figura 7. Estrutura química dos flavonoides	33
Figura 8. Regulação da absorção da glicose antes e após a refeição H – hidrolase (alfa-glicosidase)	46
Figura 9. Diagrama de fluxo de purificação de extratos de hidroacetoetanólicos de maçã (<i>Malus domestica</i> Borkh cv. <i>Gala</i>)	54
Figura 10. Diagrama de fluxo de fracionamento de extratos hidroacetoetanólicos de maçã (<i>Malus domestica</i> Borkh cv. <i>Gala</i>)	54
Figura 11. Redução do MTT a formazan no interior da mitocôndria celular.	63
Figura 12. Compostos fenólicos totais, antocianinas totais e atividade antioxidante do extrato purificado e das frações de maçã cv. <i>Gala</i>	75
Figura 13. Cromatogramas UPLC-Qtof-Ms em modo negativo para frações e extrato de maçã cv. <i>Gala</i>	82
Figura 14. Ensaio Cometa (Comet Score) em culturas de fibroblastos humanos submetidos à radiação ultravioleta e incubados com frações e extrato	95
Figura 15. Viabilidade celular sob efeito do extrato purificado e das frações em culturas de MRC-5 em 72h	97
Figura 16. Morte celular após tratamento com extrato purificado em culturas de B16F10 em 24h (A), 48h (B) e 72h (C)	98
Figura 17. Morte celular após tratamento com extrato purificado em culturas de SK-Mel-103 em 24h (A), 48h (B) e 72h (C)	99
Figura 18. Morte celular após tratamento com fração I em culturas de B16F10 em 24h (A), 48h (B) e 72h (C)	100

Figura 19. Morte celular após tratamento com fração II em culturas de B16F10 em 24h (A), 48h (B) e 72h (C)	101
Figura 20. Morte celular após tratamento com fração III em culturas de B16F10 em 24h (A), 48h (B) e 72h (C)	102
Figura 21. Morte celular após tratamento com fração IV em culturas de B16F10 em 24h (A), 48h (B) e 72h (C)	103
Figura 22. Morte celular após tratamento com fração I em culturas de SK-Mel-103 em 24h (A), 48h (B) e 72h (C)	105
Figura 23. Morte celular após tratamento com fração II em culturas de SK-Mel-103 em 24h (A), 48h (B) e 72h (C)	106
Figura 24. Morte celular após tratamento com fração III em culturas de SK-Mel-103 em 24h (A), 48h (B) e 72h (C)	106
Figura 25. Morte celular após tratamento com fração IV em culturas de SK-Mel-103 em 24h (A), 48h (B) e 72h (C)	108
Figura 26. Imagens das zonas de inibição após tratamento de culturas de bactérias patogênicas com extrato e frações fenólicas de maçã cv. gala	113

Lista de tabelas

Tabela 1. Características da obtenção das unidades experimentais da maçã <i>cv. Gala</i>	55
Tabela 2. Delineamento experimental para caracterizar composição, atividade antioxidante e estabilidade de extratos de maçã <i>cv. Gala</i>	68
Tabela 3. Delineamento experimental da capacidade antienvelhecimento de extratos de maçã <i>cv. Gala</i>	69
Tabela 4. Delineamento experimental da capacidade anticarcinogênica de extratos de maçã <i>cv. Gala</i> frente a células de melanoma	70
Tabela 5. Delineamento experimental da atividade antibacteriana dos extratos de maçã <i>cv. Gala</i>	71
Tabela 6. Delineamento experimental da atividade inibitória de enzimas digestivas de extratos de maçã <i>cv. Gala</i>	72
Tabela 7. Perfil fenólico de extrato purificado e de frações liofilizadas de maçã <i>cv. Gala</i>	80
Tabela 8. Concentração total de compostos fenólicos (μg) do extrato purificado e das frações de maçã <i>cv. Gala</i> de acordo com alteração de pH, de luz e tempo de armazenamento	84
Tabela 9. Concentração total de antocianinas (μg) do extrato purificado e das frações liofilizadas de maçã <i>cv. Gala</i> de acordo com alteração de pH, de luz e tempo de armazenamento	86
Tabela 10. Atividade antioxidante total de extrato purificado e frações de maçã <i>cv. Gala</i> de acordo com alteração de pH, de luz e tempo de armazenamento	88
Tabela 11. Efeito do extrato purificado de maçã <i>cv. Gala</i> na viabilidade e na citotoxicidade celular em tratamentos com diferentes concentrações	90
Tabela 12. Valores de IC_{50} (μM) após tratamento de células com frações e extrato purificado da maçã <i>cv. Gala</i> por 72 horas	110
Tabela 13. Zonas de inibição (mm) obtidas pelo método de difusão em disco após exposição de culturas de bactérias patogênicas à extratos fenólicos de maçã <i>cv. Gala</i>	116

Tabela 14. Concentração bactericida mínima (CBM) de extratos fenólicos de maçã cv. Gala contra bactérias patogênicas	117
Tabela 15. Concentração inibitória mínima (CIM) de extratos fenólicos de maçã cv. gala contra bactérias patogênicas	119
Tabela 16. Atividade antioxidante e inibição das enzimas α -glicosidase e α -amilase por extratos e frações de maçã cv. <i>Gala</i>	124

Lista de Abreviaturas e Siglas

ABPM	Associação brasileira dos produtores de maçã
ATT	Acidez titulável
B16F10	Culturas celulares de melanoma de camundongo
CBM	Concentração bactericida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
DAD	Detector de arranjo de diodos
DCTA	Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DM ₂	Diabetes Mellitus tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	Ácido 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
EM	Espectrômetro de massas
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAEM	Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
GSH	Glutathione
LDH	Lactato desidrogenase
MRC5	Culturas celulares de fibroblastos
MTT	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3,4-diphenyl tetrazolium) bromide</i>
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidase
NaOH	Hidróxido de sódio
PPGCTA	Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos
RASIP	Empresa Randon Agrosilvopastoril S.A.
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> (Espécies reativas de oxigênio)
SGLT1	Proteína de transporte sódio-glicose 1
SGLT2	Proteína de transporte sódio-glicose 2
SK-Mel-103	Culturas celulares de melanoma humano
SPE	<i>Solid phase extraction</i> (Extração em fase sólida)
SST	Sólidos solúveis totais
UFCSPA	Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre
UFPeI	Universidade Federal de Pelotas

UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
UV	Ultravioleta
UVA	Raio ultravioleta A
UVB	Raio ultravioleta B
UVC	Raio ultravioleta C

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	19
2.OBJETIVOS.....	22
2.1 Geral.....	22
2.2 Específicos	22
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	23
3.1 Características e propriedades físico-químicos da fruta maçã cv. Gala	23
3.2 Compostos bioativos da maçã cv. Gala	27
3.3 Efeitos dos compostos bioativos da maçã na prevenção e no tratamento do câncer.....	37
3.4 Efeitos dos compostos bioativos da maçã contra microrganismos.....	43
3.5 Efeitos dos compostos da maçã na redução da glicemia	45
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	52
4.1 Material Experimental	52
4.1.1 Colheita, armazenamento e transporte	52
4.2 Métodos	52
4.2.1 Obtenção do extrato bruto.....	53
4.2.2 Obtenção das frações e do extrato purificado	54
4.2.3 Identificação de compostos fenólicos individuais.....	57
4.2.4 Atividades biológicas das frações e do extrato purificado.....	58
5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	69
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	75
6.1 Compostos bioativos da maçã cv. Gala	75
6.2 Estabilidade do extrato purificado e das frações fenólicas de maçã cv. gala	85
6.3 Atividade biológica do extrato purificado e das frações de maçã cv. Gala	91
6.3.1 Efeitos na prevenção e no tratamento do câncer	91
6.3.2 Efeitos dos compostos contra à microrganismos.....	113
6.3.3 Efeitos dos compostos na redução da glicemia.....	125
7. CONCLUSÕES.....	130
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	131
REFERÊNCIAS.....	132

1. INTRODUÇÃO

A maçã (*Malus domestica* Borkh) tem sua produção mundial em destaque especialmente em regiões de clima temperado. No Brasil, consolidou-se em 1989 e desde lá a safra do setor, que acontece entre fevereiro e abril, cresce a cada ano (KLANOVICZ et al., 2010). No ano de 2017, sua produção foi de 1.254.614 toneladas no ano de 2017 com rendimento de 37.740 kg por hectare de área plantada, onde a região sul representou 23% da produção nacional e o estado do Rio Grande do Sul, 25% (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2017; FAO, 2019) devido as suas condições climáticas subtropicais temperadas serem as mais parecidas às condições exigidas pela planta (KLANOVICZ et al., 2010).

A maçã está entre as seis frutas mais exportadas pelo Brasil, especialmente para Estados Unidos e União Europeia (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA E, 2017). Dentre o equilíbrio de receita financeira entre o total de exportações (55.437.969 kg) e de importações (78.501.713 kg), o país perde pelo menos US\$ 33.640.089 (BENNO et al., 2018) e isso provavelmente seja reflexo da exportação de produto *in natura* e importação de produtos com maior valor agregado. No Brasil, parte da safra é consumida tanto *in natura* quanto processada na forma de suco, geleia, purê e cidra, uma menor parte é perdida durante a colheita e pós-colheita como transporte ou armazenamento (KLANOVICZ et al., 2010).

O consumo de maçãs ou de seus derivados parece promover benefícios para saúde global dos indivíduos. Estudos epidemiológicos mostram que existe forte relação de causa e efeito, entre ingestão de frutas e hortaliças e benefícios à saúde, incluindo a prevenção de câncer, doenças coronarianas e neurodegenerativas (Alzheimer e Parkinson) (HYSON, 2011).

Os compostos fenólicos, presentes na fruta, tanto na polpa e e principalmente na casca da maçã, tem sido relacionados a estes efeitos positivos, principalmente pelo equilíbrio redox que os fitoquímicos promovem (WOLFE; LIU, 2003; KALINOWSKA et al., 2014; XU et al., 2016), pois eles desempenham papel fundamental na prevenção de danos oxidativos em biomoléculas e nas patologias associadas (HYSON, 2011).

Em suco de maçã e cidra, os compostos fenólicos contribuem, significativamente, nas características sensoriais como cor, adstringência e amargor. Pela sua elevada

atividade antioxidante, os polifenóis também atuam como protetores celulares (BABBAR et al., 2015) e têm sido elencados como inibidores de microrganismos patogênicos (BAGAMBOULA et al., 2003). A deterioração de alimentos por microrganismos pode manifestar-se como crescimento visível (lodo, colônias), como mudanças de textura (degradação de polímeros) ou como alteração de aroma (*off-odors*) e de sabor (*off-flavors*) (GRAM et al., 2002), além de eventualmente também estarem presentes microrganismo patogênicos e/ou suas toxinas (RAWAT, 2015). Frutas, hortaliças, plantas medicinais e condimentares com maior concentração de fenólicos geralmente apresentam maior atividade antimicrobiana e antioxidante, sendo promissora a sua utilização no controle de bactérias patogênicas ou deteriorantes em alimentos (ALBAYRAK et al., 2010).

Maçãs, independente de cultivar, contêm quantidades significativas de compostos fenólicos, os quais são responsáveis por vários atributos sensoriais da fruta como cor, amargor e adstringência (ALBERTI et al., 2016). Os principais compostos em maçãs incluem ácidos fenólicos (especialmente, ácido clorogênico), flavanóis (catequina, epicatequina e procianidinas), dihidrochalconas (floridizinas), flavonóis (glicosídeos da quercetina) e antocianinas (cianidina glicosídeos) (TREUTTER, 2001; TSAO et al., 2005), sendo os dois últimos como regra geral, presentes exclusivamente na casca (AWAD et al., 2001). Estudos em diferentes cultivares de maçã evidenciam uma elevada atividade antioxidante e inibição de crescimento de células cancerígenas *in vitro*, como câncer de mama, pele e outros. Frente às doenças crônicas não transmissíveis, já existem evidências científicas que os compostos fenólicos, por seu potente poder de equilíbrio redox, agem na prevenção e também no tratamento delas (TSAO et al., 2003; HARRIS et al., 2016). Estudos demonstram que maçãs contêm elevado conteúdo total de fenólicos e atividade antioxidante (JELODARIAN et al., 2011).

Com base nisto, os compostos de maçã poderiam ser utilizados no tratamento de doenças, especialmente as crônicas. O melanoma é uma forma agressiva de câncer de pele que se desenvolve a partir de melanócitos derivados da crista neural, e possui elevado potencial metastático, fator que determina o curso do tratamento. Quando diagnosticado em seus estados iniciais, o melanoma muitas vezes pode ser curado por cirurgia, porém, quando diagnosticado nos estágios metastáticos, o prognóstico é ruim, necessitando de novas terapias que possam ter menores efeitos colaterais e danos aos pacientes. Neste

sentido, a quercetina tem sido destaque em diversos estudos científicos de revisão, *in vitro* e *in vivo* (VARGAS; BURD, 2010; HARRIS et al., 2016).

Outra morbidade, amplamente distribuída mundialmente, que os compostos referidos possuem efeito positivo na prevenção é a Diabetes Mellitus (TSAO et al., 2003). Porém, além de prevenir, a ideia é usar os benefícios da fruta como agente substitutivo dos hipoglicemiantes orais.

Muito embora a maçã seja bastante estudada quanto aos seus benefícios para a saúde (LEONTOWICZ et al., 2002; BOYER; LIU, 2004), o uso de maçã como fonte de moléculas bioativas para uso farmacêutico e/ou industrial ainda é limitado (SHOJI et al., 2004; JELODARIAN et al., 2012; FRANCINI; SEBASTIANI, 2013). Além da ausência de produtos nacionais a base de extratos derivados de maçã para uso nas indústrias farmacêuticas, cosméticas ou alimentícias, vislumbrou-se a necessidade de desenvolver diversos extratos ricos em fenólicos através do fracionamento e testar suas atividades biológicas para uso posterior na produção de perfumes, produtos para higiene pessoal, cosméticos para proteção da pele, e produtos com ação antioxidante e/ou antimicrobiana para alimentos. Com base nisso, a ideia central de concentrar extratos de maneira não convencional na pesquisa com maçãs e verificar a bioatividade dos fenólicos em várias frentes foi estudado, sendo um estudo inédito na área de fenólicos e de maçã.

Este estudo constitui, uma etapa inédita na literatura de concentrar compostos fenólicos da maçã e faz parte do projeto temático de pesquisa intitulado “Inovação tecnológica para a elaboração de produtos que agreguem valor a cadeia da maçã”, coordenado pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Clima Temperado de Pelotas, com a colaboração do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA) da Universidade Federal de Pelotas (UFPeI), dentre outras Universidades e Instituições de Pesquisa.

Assim, neste estudo buscou-se gerar conhecimentos que subsidiem a utilização de extratos de maçã como ingredientes ativos na proteção da pele contra o fotoenvelhecimento e câncer, e também na preservação, sanidade e funcionalidade de alimentos.

2.OBJETIVOS

2.1 Geral

- Obter conhecimentos que subsidiem a utilização de extratos hidroacetanólico concentrados de maçã como ingredientes ativos na proteção da pele contra o fotoenvelhecimento e câncer, sobre atividade antidiabética e também na preservação, sanidade e funcionalidade de alimentos.

2.2 Específicos

- Purificar, fracionar e caracterizar qualitativamente o perfil fenólico de quatro frações e um extrato purificado de maçã cv. Gala;
- Verificar a capacidade fotoprotetiva e antiproliferativa de compostos de maçã em culturas celulares de fibroblastos (MRC5) via testes *in vitro*;
- Testar a estabilidade dos compostos bioativos encontrados nas frações cromatográficas frente à fatores edafoclimáticos extrínsecos e intrínsecos (temperatura, luminosidade e pH) ao longo do tempo (0 h, 24 h e 48 h) a partir de sua atividade antioxidante, conteúdo total de fenólicos e conteúdo total de antocianinas;
- Avaliar a capacidade anticarcinogênica/antiproliferativa de compostos de maçã em culturas epiteliais de linhagens tumorais de melanoma (murino B16F10, humano SK-Mel-103) via testes *in vitro*;
- Testar extratos fenólicos contra bactérias patogênicas Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*) e Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Salmonella enterica* serovar Typhimurium);
- Avaliar o efeito inibitório do extrato purificado e das frações de maçã sobre as enzimas digestivas α -glicosidase e α -amilase.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Características e propriedades físico-químicos da fruta maçã cv. Gala

O gênero *Malus* compreende cerca de 55 espécies, dentre essas, a maçã (*Malus domestica* Borkh), com origem no Oriente Médio e Leste Asiático, destaca-se pela sua importância na alimentação humana (HARRIS; ROBINSON; JUNIPER, 2002).

É popularmente conhecida e cientificamente classificada dentro desse gênero como *Malus domestica* cv. Gala (HARRIS; ROBINSON; JUNIPER, 2002). Ela pertence à família Rosaceae, uma cultura de frutas de clima temperado. É uma das espécies frutíferas com uma das frutas mais populares do mundo. Existe mais de 7.000 cultivares registradas mundialmente (NOITON; ALSPACH, 1996). No Brasil, a cultura da macieira iniciou seu desenvolvimento comercial somente na década de 70, porém são inúmeras as referências sobre a introdução de cultivares, iniciativas de plantio ou fomentos anteriores a esse período (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE MAÇÃ, 2019).

A maçã, pela sua diversidade de adaptação climática, tornou-se a árvore frutífera mais amplamente cultivada da zona temperada e uma das mais cultivadas no mundo. Após, citros, uva, e banana, é a quarta planta mais importante economicamente (HUMMER; JANICK, 2009). A maçã é uma fruta climatérica é globosa com uma profunda depressão no ponto de inserção da haste, que o prende aos ramos, possuindo coloração vermelha, no caso da gala, ou verde, outras cultivares, podendo apresentar pequenas manchas esverdeadas ou amareladas. Além do seu consumo fresco, uma quantidade significativa de maçã também é processada em produtos como em suco, concentrado de suco, sidra, vinagre e produtos enlatados (RANA; BHUSHAN, 2016).

A macieira possui flores hermafroditas com um tipo gametofítico de autoincompatibilidade controlada por um único locus multialélico. A maçã é um pseudofruto que não se desenvolve a partir do ovário da flor e sim do receptáculo floral e se divide em semente, endocarpo, mesocarpo e epicarpo. A figura 1 apresenta o desenvolvimento da fruta e a maçã já formada com suas partes polpa e polpa mais casca, além das sementes, definidas em: epicarpo que é a casca, mesocarpo que é a polpa e endocarpo, a semente.

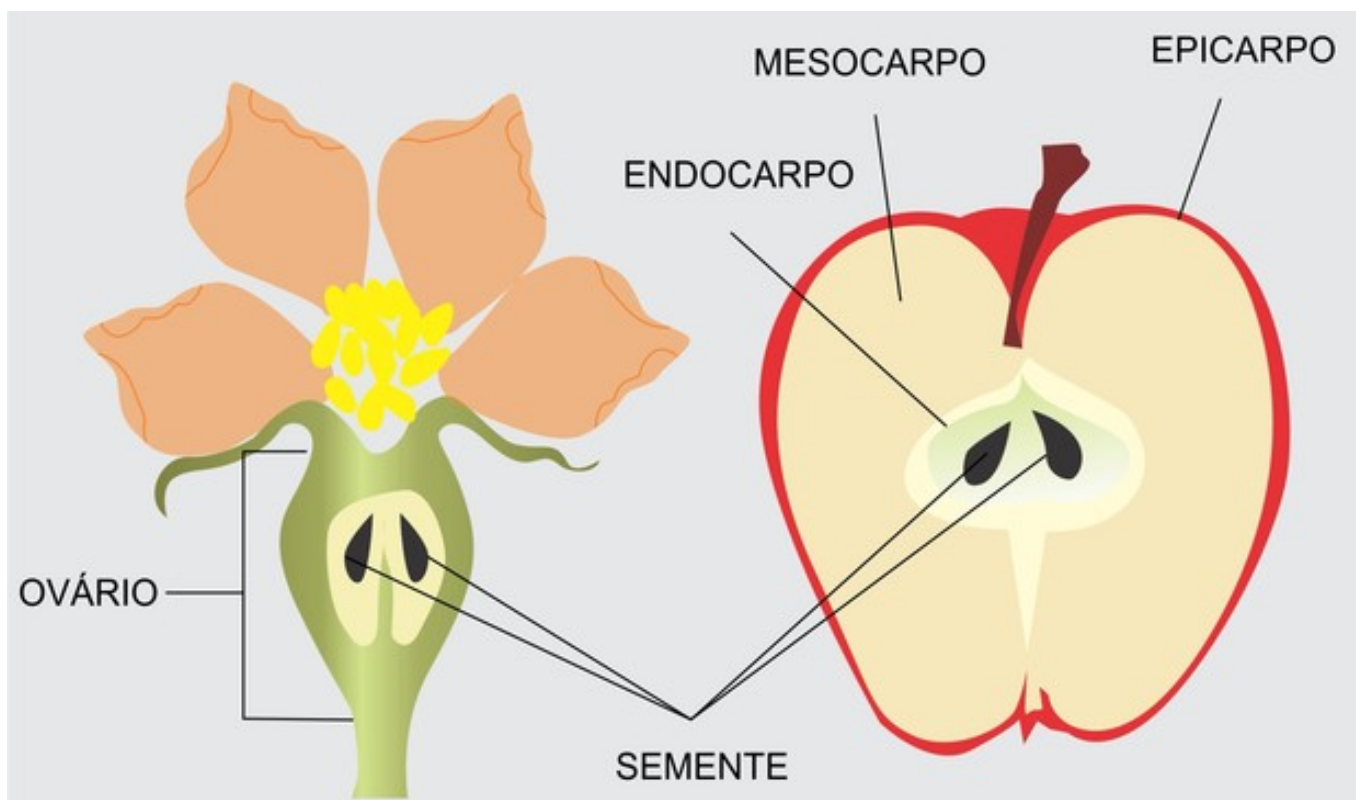


Figura 1. Pseudofruto maçã cv. gala.

O Brasil ocupa nona posição mundial em produção de maçã, com produção de 1,1 milhão de toneladas no ano de 2018. No Brasil, os estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul respondem por 99 % da produção nacional (BENNO et al., 2018). As projeções de produção pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento indicam uma expansão anual de 2,7 % na produção brasileira de maçã, devendo aumentar 29,8 % até o ano de 2023 (BRASIL, 2013; BENNO et al., 2018).

A maturação da maçã cv. *Gala* inicia-se ao final de janeiro e segue até a segunda quinzena de fevereiro. Porém, existem tecnologias de pós-colheita disponíveis que permitem que essa cultivar seja armazenada até o final do ano do qual foi produzida (BRASIL, 2013). A doçura é um dos principais impulsionadores da preferência do consumidor pela fruta e, portanto, esta variável é priorizada em programas de melhoramento de macieiras. A doçura percebida na fruta pelo consumidor se dá principalmente pelo teor de sorbitol e não tanto pelo teor de açúcar individual ou teor de açúcar total. Autores descobriram que contribuição mais importante para a doçura das frutas é fornecida por vários compostos voláteis, principalmente ésteres e farneseno (APREA et al., 2017).

O metabolismo primário e secundário da maçã é ilustrado na figura 2. No metabolismo primário o carbono resultante da fotossíntese é utilizado na síntese de todos os compostos orgânicos. Em 100 g de maçã fresca há cerca de 65 calorias, 83 % de água, 15 g de carboidratos, 0,3 g de proteínas, 0,5 g lipídeos e 2,1 g de fibra. Os micronutrientes mais prevalentes são: cálcio (7,0 mg), magnésio (15,0 mg), fósforo (21,0 mg), potássio (419,0 mg), vitamina A (10,0 mg), vitamina E (0,5 mg) e vitamina C (2,0 mg) (UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 2019).

Recentemente, foi lançada a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos com uma lista complementar de alimentos com a relação de flavonóides em amostras *in natura*. Dentre os compostos presentes nas maçãs em mg/100g, estão quercetina (0,4), catequina (1,3), epicatequina (5,4) na fuji, quercetina (10,1), catequina (5,1) e epicatequina (10,4) na gala e quercetina (2,3), catequina (1,6), epicatequina (5,5) na maçã verde (UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 2017). Estes dados são de alimentos *in natura* e inteiro e já se sabe que o preparo do alimento, como descascamento ou cocção, interfere na redução dos teores destes compostos (D'ARCHIVIO et al., 2007).

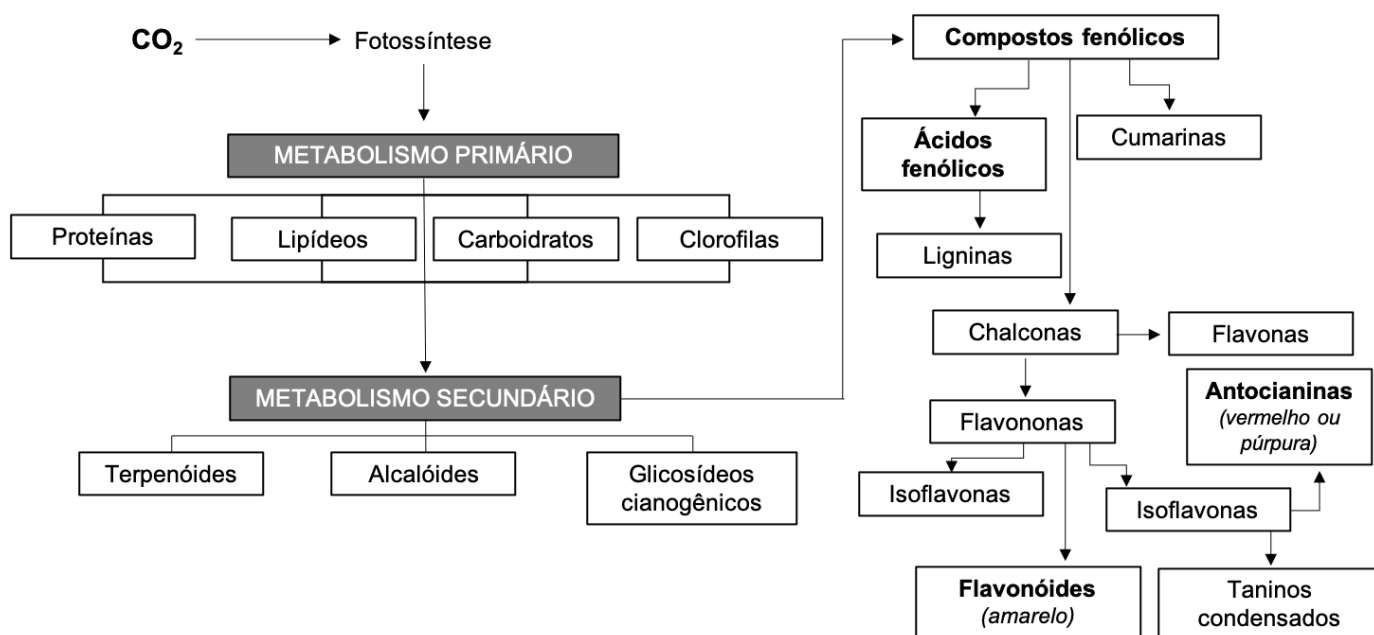


Figura 2. Metabolismo primário e secundário da maçã cv. gala.
Adaptado de Vuolo, Lima e Maróstica-Junior (2019).

Dentre os compostos do metabolismo primário, a pectina destaca-se como a fibra solúvel mais importante na maçã. Durante a digestão gastro-intestinal, a pectina alcança o cólon e sofre bioconversão extensiva pela microbiota colônica, produzindo metabólitos que podem ter efeitos locais no intestino, tais como redução no trânsito intestinal, melhor esvaziamento gástrico e melhor absorção de nutrientes, além de sistêmicos após a absorção, especialmente na redução da colesterolemia e hiperglicemia (KOUTSOS; TUOHY; LOVEGROVE, 2015).

A qualidade de consumo da maçã é definida como a combinação de diferentes características, tais como aparência, textura, sabor e valor nutricional. Já em relação à maturação da fruta, as variáveis mais correlacionadas são teor de sólidos solúveis, de ácidos, firmeza da polpa, cor da epiderme e *ratio* (razão entre acidez total e teor de sólidos solúveis) (JONGEN, 2002). Na maturação da maçã ocorre produção de compostos aromáticos, resultantes de vias metabólicas complexas, de forma coordenada, em diferentes tipos de células e organelas celulares. O acúmulo de compostos voláteis depende de fatores genéticos, edafoclimáticos, práticas culturais, idade das plantas e condições de colheita e de pós-colheita. Os compostos voláteis não são produzidos em quantidades significativas durante o crescimento da maçã, mas aumentam durante o período do climatério, quando a produção de etileno induz uma série de mudanças físicas e químicas na expressão de certos genes e na atividade de certas enzimas (ESPINO-DÍAZ et al., 2016).

A aparência da fruta é um critério primordial na decisão de compra da mesma, sendo caracterizada pelo tamanho, forma, cor e ausência de defeito para o consumo da fruta *in natura* (STEFFENS et al., 2006). Porém, cerca de 30 % da produção nacional é destinada à industrialização (sucos), seja por não apresentar o padrão mínimo para o consumo *in natura*, em decorrência de danos físicos, fisiológicos ou causados por pragas e doenças, ou por falta com refrigeração de local para armazenamento pós-colheita. Na produção de suco, uma das principais formas de industrialização de maçã, ocorre o descarte sólido (bagaço) composto por casca, polpa e semente (VILELA, 2014).

Novas tecnologias que permitam a utilização desse descarte sólido, contribuirão para agregar valor à cadeia produtiva de maçã. A utilização de metabólitos de maçã na indústria cosmética tem tido destaque recente na economia nacional. Potencialmente, estes metabólitos podem ser utilizados em cosméticos, medicamentos, alimentos, bebidas, e

suplementos alimentares, contribuindo para prevenir e tratar doenças diversas (DUKHI; TAYLOR, 2018).

3.2 Compostos bioativos da maçã cv. Gala

Existe uma valorização crescente do consumo de alimentos ricos em substâncias protetoras da saúde humana. Isto inclui a maçã, rica em fitoquímicos com potencial para atuarem como moduladores de processos de desenvolvimento de doenças, incluindo o câncer, doenças cardiovasculares, asma, diabetes, doenças pulmonares, Alzheimer e outras doenças degenerativas (GERHAUSER, 2008; HYSON, 2011). O consumo desta fruta está relacionado a efeitos positivos no envelhecimento e declínio cognitivo, controle de peso, saúde óssea, função pulmonar, saúde gastrointestinal e na síndrome metabólica (HYSON, 2011; DUKHI; TAYLOR, 2018).

A comunidade científica tem associado o consumo de maçãs a prevenção de doenças, principalmente pelo elevado teor de compostos antioxidantes presentes nesta fruta (HYSON, 2011). Os fenólicos da maçã atuam como antioxidantes eficazes, protegendo as células contra os efeitos prejudiciais dos radicais livres e inibindo a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade.

Os metabólitos secundários presentes na maçã, como os flavonoides, isoflavonóides, carotenoides e ácidos fenólicos, são essenciais para o crescimento e reprodução das plantas, inclusive interferindo em propriedades sensoriais como cor, aroma, adstringência ou amargor. Os compostos fenólicos têm origem na via do chiquimato e do fenilpropanóide, que fornece diretamente os fenilpropanóides, ou segue na via do malonato, produzindo fenóis simples, ou ambos (LIN et al., 2016). A figura 3 ilustra a estrutura básica de um fenol.

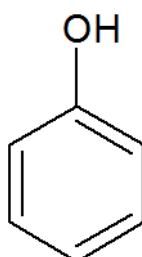


Figura 3. Estrutura química básica do fenol. Adaptado de Kim; Keogh; Clifton, 2016

As atividades biológicas relacionadas para maçãs estão relacionadas com sua composição química, principalmente com compostos fenólicos. Alguns alimentos, assim como a maçã, contêm antioxidantes que inibem ou reduzem os danos causados pelos radicais livres nas células (BIANCHI; ANTUNES, 1999). Esses radicais livres são moléculas orgânicas e inorgânicas e átomos que contêm um ou mais elétrons não pareados, com existência independente, e essa configuração faz deles moléculas altamente instáveis, com meia-vida curtíssima e quimicamente muito reativas (HALLIWELL, 1994). O desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes que resulta na indução de danos celulares pelos radicais livres é chamado de estresse oxidativo (SIES, 1993).

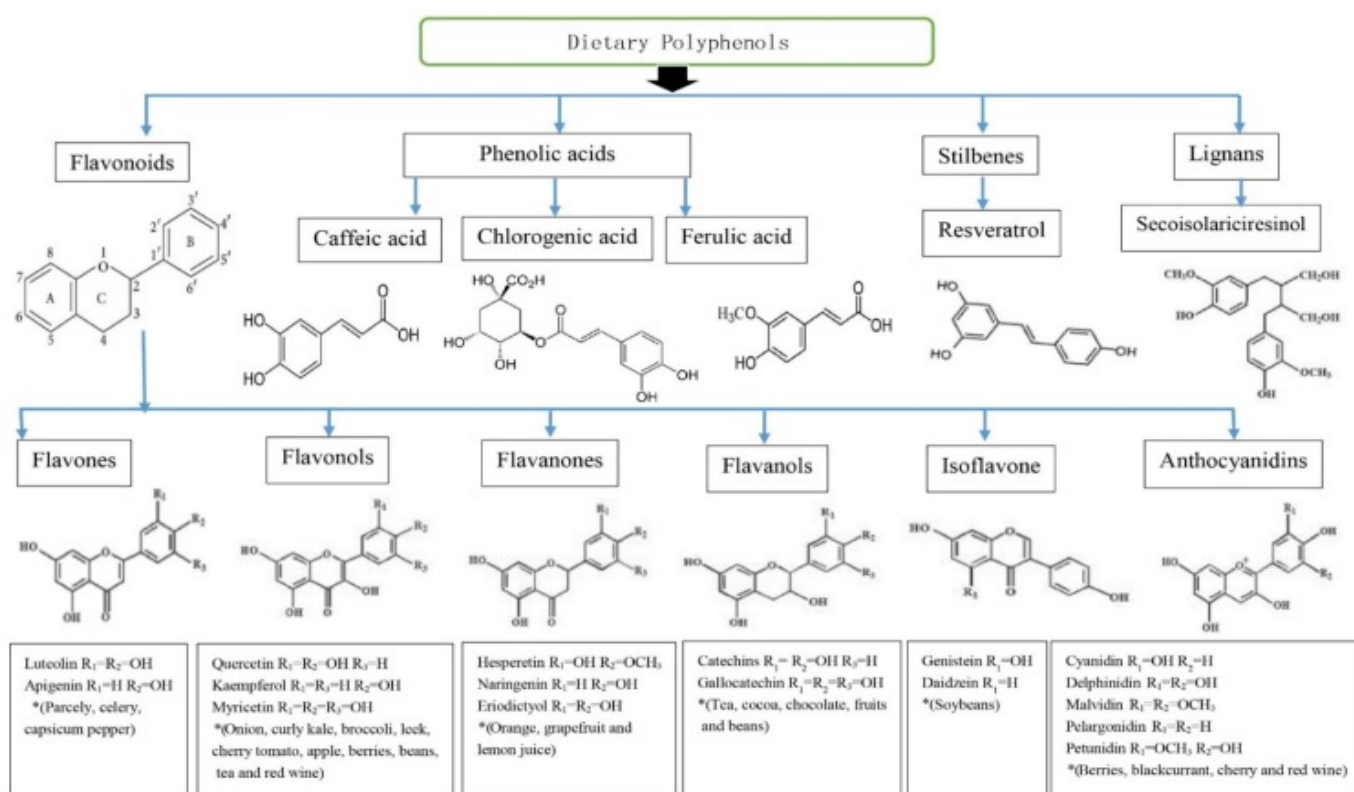


Figura 4. Classificação dos compostos fenólicos. Adaptado e traduzido de Kim; Keogh; Clifton, 2016.

Os antioxidantes são capazes de agir em diferentes etapas (prevenção, interceptação e reparação) e através de distintos mecanismos: reduzindo agentes oxidantes pela doação de hidrogênio, extinguindo o oxigênio *singlet*, e atuando como quelantes de radicais livres (DEVASAGAYAM et al., 2004; IACOPINI et al., 2010).

Diferentes grupos de compostos fenólicos têm características biológicas diferentes, e muito pouco se sabe sobre os mecanismos pelos quais eles poderiam contribuir para a prevenção ou recuperação de doenças. Maçãs possuem elevados teores de polifenóis, que são divididos em vários grupos, incluindo ácidos hidroxibenzóicos, ácidos hidroxicinâmicos e seus derivados, flavonóis, diidrocalos, antocianóides, flavonoides monoméricos e flavonoides oligoméricos (KALINOWSKA et al., 2014; HYUN; JANG, 2016).

A figura 4 ilustra a classificação dos compostos fenólicos. O termo "fenol" define um composto com um anel fenil comportando um ou mais substituintes hidroxila, ou seja, os compostos fenólicos possuem um anel aromático e vários grupos hidroxila ligados a ele, podendo ser classificados em diferentes grupos, em função do número de anéis fenólicos que contêm e dos radicais que ligam esses anéis a outro (MANACH et al., 2005; VUOLO; LIMA; MARÓSTICA JR., 2018). Os fenólicos possuem esta característica antioxidante especialmente por conter ligação dupla no carbono 2 e 3 e em conjunto com um grupo 4-carbonil, pois proporciona planaridade, expansão de elétrons e deslocamento entre anéis adjacentes. A forma de C-glicosídeo demonstrou maior capacidade antioxidante quando comparado ao O-glicosídeo em ensaios e a glicosilação também interfere com a planaridade, metilação e no deslocamento de elétrons. A porção funcional também pode influenciar a atividade antioxidante do composto, bem como as interações sinérgicas e antagônicas das moléculas (VUOLO; LIMA; MARÓSTICA JR., 2018).

Os fenóis são potentes antioxidantes que impedem as biomoléculas (proteínas, ácidos nucleicos, lipídios poliinsaturados e açúcares) de sofrer danos oxidativos através de reações mediadas por radicais livres. Existem dois mecanismos principais pelos quais os antioxidantes realizam essas propriedades: inativação de radicais livres e transferência de elétrons para formar radicais estáveis (VUOLO; LIMA; MARÓSTICA JR., 2018).

Os compostos fenólicos também podem afetar positivamente ou negativamente as características sensoriais dos alimentos com impactos na cor, sabor e adstringência (OLIVEIRA; CARVALHO; MELO, 2014). Já na planta os fenólicos têm um papel fundamental como compostos de defesa da planta frente a estresses ambientais, como luz excessiva, baixas temperaturas, estresse hídrico (por excesso ou falta de água), infecção de patógenos, danos por herbívoros e deficiência de nutrientes e com isso podem levar a um aumento na produção de radicais livres e outras espécies reativas nas plantas. Estes estresses, sejam bióticos ou abióticos, estimulam fluxos de carbono das vias metabólicas

primárias para as secundárias, induzindo assim uma mudança dos recursos disponíveis em favor da síntese de produtos secundários. Uma ligação interessante entre o metabolismo primário e secundário acopla a acumulação do metabolito de estresse prolina com a transferência de energia para a biossíntese de fenilpropanóide através da via oxidativa das pentoses fosfato. A oxidação alternada do NADPH pela síntese de prolina e redução de NADP⁺ pelos dois passos oxidativos da via das pentoses fosfato oxidativas leva ao acúmulo simultâneo de compostos fenólicos na planta (VUOLO; LIMA; MARÓSTICA JR., 2018).

Os compostos fenólicos da maçã, parecem atuar como antioxidantes naturais que eliminam os radicais livres e/ou inibem sua produção, estimulam a síntese de enzimas antioxidantes e, assim, previnem o estresse oxidativo, que resultariam em danos às moléculas estruturais do corpo (HIDER, R.C.; LIU, Z.D.; KHODR, 2001; NIJVELDT et al., 2001; LI et al., 2014).

A estrutura dos flavonóides é composta de um núcleo de 3 anéis, dependendo da presença de um grupo 3-OH e uma ligação dupla a 2, as famílias flavona, flavanol e flavanona são geradas. As antocianidinas têm um anel C totalmente aromatizado e, como resultado, são carregadas positivamente. Os taninos também estão relacionados aos flavonóides, mas geralmente estão presentes como polímeros de alto peso molecular. Chalconas são compostos arilcetônicos relacionados, nos quais o anel C não existe. Existem enormes variações estruturais à medida que diferentes substituições entram em jogo nesse esquema (GONZÁLEZ et al., 2011).

Maçãs contêm uma variedade de compostos fenólicos como (+) -catequina e (-) -epicatequina (flavan-3-óis ou flavanois), floridizina (di-hidrocalcono glicosídeos), quercetina (flavonóis), cianeto (antocianidinas), cianidina-3- O-galactósido (antocianinas), ácido clorogênico (ácidos fenólicos) e hidroxicinamas (ácido p-cumárico). Estudo de revisão de literatura mostrou que os efeitos da cultivar podem ser relevantes, a variabilidade genética dentro do germoplasma de macieira pode fornecer uma variação genética significativa na composição polifenólica, pois o conteúdo total de polifenóis varia entre 56 mg ácido gálico/ 100 g de massa fresca e 221 mg ácido gálico / 100 g de massa fresca em cultivares maçã Gala e Panaia, respectivamente (FRANCINI; SEBASTIANI, 2013). Também revelaram que o conteúdo polifenólico por fruta é bastante variável: 19,6 mg - 55,8 mg (flavan-3-ols), 17,7 mg - 33,1 mg (flavonóis) e 10,6 mg - 80,3 mg (ácido clorogênico),

1,0 mg - 9,3 mg (florentina), e 0,1 mg - 6,5 mg (antocianina) (FRANCINI;SEBASTIANI, 2013) (Figura 5).

Na figura 5 percebe-se que os compostos fenólicos estão diferentemente distribuídos na fruta e que o epicarpo é mais rico em compostos do que os outros tecidos da maçã. Alguns grupos de flavonoides são quase exclusivamente encontrados no epicarpo, como antocianinas e flavonóis (glicosídeos da quercetina). Por outro lado, flavan-3-ol monoméricos e poliméricos são os principais fenólicos do epicarpo e mesocarpo e podem representar cerca de 60 % do total de compostos fenólicos em maçãs. Floridizina, que pode ser usado como um biomarcador químico de produtos de maçã, está distribuída no epicarpo e mesocarpo, bem como os ácidos hidroxicinâmicos (ALBERTI et al., 2017).

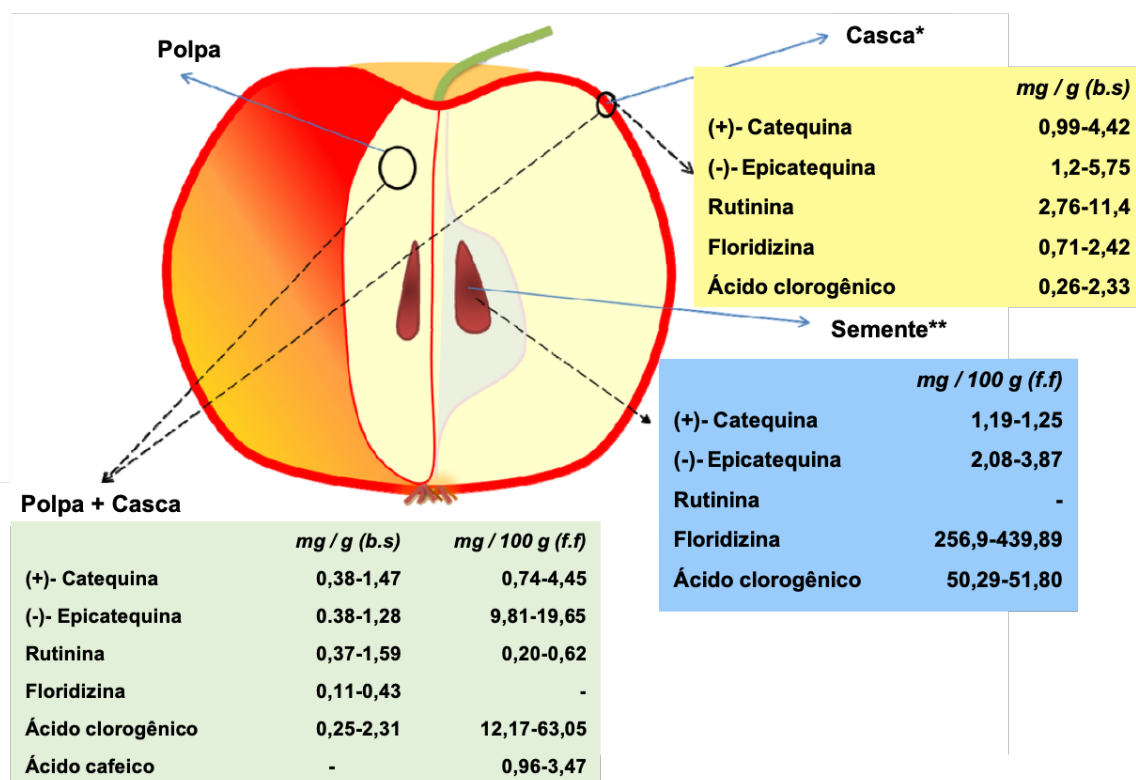
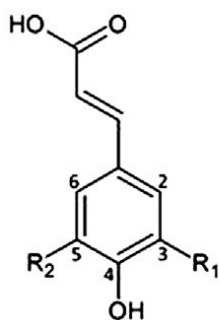


Figura 5. Concentrações das moléculas de polifenóis na semente, casca e casca mais polpa. b.s: base seca; f.f.: fruta fresca; - não medido. (FRANCINI; SEBASTIANI, 2013)

A propriedade antioxidante da maçã tem sido confirmada por conter elevado teor de polifenóis distribuídos na epiderme e na polpa (REAGAN-SHAW et al., 2010). Em particular, as proantocianidinas oligoméricas parecem ser as mais determinantes da atividade antioxidante de extratos de maçã (VANZANI et al., 2005).

Já os ácidos fenólicos (ácidos fenolcarboxílicos) são fenóis que incluem substâncias contendo um anel fenólico e pelo menos uma função de ácido carboxílico orgânico. A presença de ácido fenólico, especialmente cafeico e p-cumárico que possuem na posição 3,4 uma di-hidroxilação no anel fenólico, resulta em significativa atividade antioxidante em plantas (GOLENIOWSKI et al., 2013). Os ácidos hidrocinâmicos possuem um grupo fenil substituído por um grupo carboxílico e um ou mais grupos OH na sua estrutura química, onde a diferença entre eles está também no comprimento da cadeia contendo o grupo carboxílico. Os ácidos hidroxicinâmicos possuem um esqueleto básico de C6C3 (fenilpropanóide) e o mais abundante em alimentos vegetais é um éster de ácidos cafeico e quínico, denominado ácido clorogênico (ácido 5-cafeoilquínico) e o ácidos clorogênicos (ácido 4-cafeoilquínico) também são comuns (LA ROSA et al., 2018) (figura 6).

Hydroxycinnamic acids



	R1	R2
<i>p</i> -Coumaric acid (4-hydroxycinnamic)	H	H
Caffeic acid	OH	H
Ferulic acid	OCH ₃	H
Sinapic acid	OCH ₃	OCH ₃

Chlorogenic acid (5-caffeoylquinic acid)

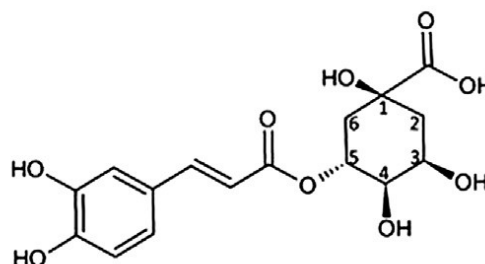


Figura 6. Estrutura química dos ácidos fenólicos (LA ROSA et al., 2018).

A quantidade desses compostos bioativos na maçã é muito variável, dependendo do ambiente de cultivo (região geográfica), localização da fruta na planta, tempo de armazenamento, e época de colheita (FENG et al., 2014). As variações existentes no conteúdo de fitoquímicos ou atividade antioxidante podem ser relativas ao período de crescimento, estação de crescimento, localização geográfica, tipo de amostra, métodos de extração utilizados e a variação de cultivar. Além disso, autores descrevem que os compostos fenólicos ocorrem em maior concentração na casca quando comparados com a

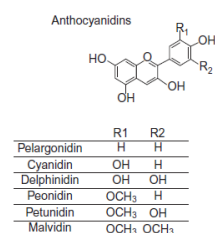
polpa da maçã (WOLFE; LIU, 2003; LATA; TRAMPCZYNSKA; PACZESNA et al., 2009; MOO-HUCHIN et al., 2015). A casca também contém maiores concentrações de ácidos ascórbico e succínico (FENG et al., 2014).

Wang e colaboradores (2014) demonstraram que a maçã cv. Gala contém consideráveis quantidades de fenólicos, flavonoides, flavonóis, antocianinas. As antocianinas, caracterizadas pela sua cor vermelho-azul-laranja, possuem diferentes números de hidroxilas na molécula, com diferentes graus de metilação das mesmas. Diferentes açúcares se ligam em diferentes posições à molécula de antocianina, com ácidos alifáticos ou aromáticos, de diferentes naturezas, ligados aos mesmos (PASCUAL-TERESA et al., 2013).

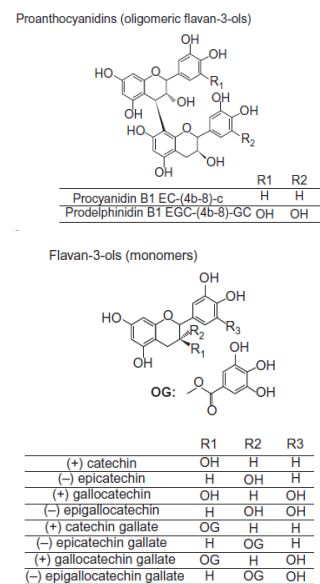
A estrutura química de um flavonoide, demonstrada na figura 7, é o núcleo flavana, que consiste em 15 átomos de carbono dispostos em três anéis fenólicos e se diferenciam no grau de saturação, oxidação e hidroxilação do anel C e são divididos em diferentes subclasses: flavonóis, flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavanóis e antocianidinas (OLIVEIRA; CARVALHO; MELO, 2014).

As antocianinas, na natureza são invariavelmente glicosiladas e contêm o cátion flavilium, que confere a esses flavonoides propriedades únicas de serem pigmentos solúveis em água e suas alterações de cor em relação ao pH da matriz. Por exemplo, em pH baixo, eles aparecem em rosa, roxo em condições neutras e amarelo esverdeado em pH básico, tornando-os indicadores naturais de pH. Se o pH é muito alcalino, eles são incolores (LA ROSA et al., 2018).

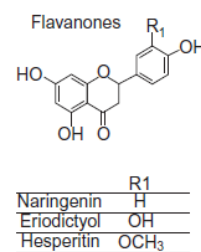
A Antocianina



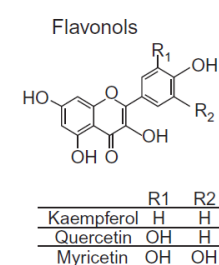
B Flavanol



C Flavanona



D Flavonol



E Dihidrochalconas



Figura 7. Estrutura química dos flavonoides. (LA ROSA et al., 2018).

R1: radical1; R2: radical2

Estes antioxidantes naturais, particularmente presentes em frutas e hortaliças têm ganhado interesse crescente dentre os consumidores e a comunidade científica, porque estudos epidemiológicos têm indicado que o consumo frequente desses compostos naturais está associado a um menor risco de doenças cardiovasculares e câncer (TEMPLE, 2000). Extratos de maçã ricos em polifenóis resultaram em inibição de atividade citosólica da proteína quinase C (enzima superexpressa no câncer) e apresentaram papel na supressão do crescimento de células de câncer humano *in vitro* (LIU; SUN, 2003).

Compostos fenólicos são amplamente distribuídos no reino vegetal como um mecanismo de proteção das plantas contra estresses bióticos e abióticos e, assim, são regularmente consumidos na dieta humana (ZHANG; TSAO, 2016). Estudos sugerem que alimentos ricos em compostos fenólicos contribuem para prevenção de doenças crônicas, incluindo o desenvolvimento e o risco de câncer (YANEZ et al., 2004; SEGUIN et al., 2013). Também contribuem para retardar o envelhecimento e morte celular devido aos seus efeitos antiproliferativo e antioxidante (WANG et al., 2013). Diferentes respostas são obtidas de acordo com o tipo ou grupo de composto antioxidante frente a diferentes tipos de câncer (SAK, 2013). Várias substâncias derivadas de plantas (ácidos fenólicos, catequinas, isoflavonas, quercetinas, resveratrol, lignanas, dentre outros) têm sido estudadas com sucesso para inibição de câncer (LAMBERT et al., 2005; SAEIDNIA S.; ABDOLLAHI M, 2013; SAK, 2014).

Compostos polifenólicos contribuem no desenvolvimento da cor, aroma, sabor e atividade metabólica em alimentos de origem vegetal (HYSON, 2011). Sun e colaboradores (2002) encontraram 296,3 ($\pm$ 6,4) equivalentes de ácido gálico em 100 g de maçã. Já Gardner e colegas (2000) encontraram concentrações de polifenóis ainda maiores em sucos comerciais de fruta. A casca de maçã pode conter o dobro da quantidade de fenólicos totais encontrada na polpa de maçã (GORINSTEIN et al., 2001; WOLFE; LIU 2003). Já a concentração de ácido ascórbico, também reconhecido como composto antioxidante, nas células vegetais é controlada pela biossíntese e reciclagem, em sincronia com o crescimento da planta, para proporcionar resistência ao estresse, sendo que sua disponibilidade depende principalmente de biossíntese (ISHIKAWA; DOWDLE; SMIRNOFF, 2006; HANCOCK; VIOLA, 2005; GIOVANNONI, 2007).

À quercetina, um tipo de flavonoide, tem sido creditada a função de prevenção de danos induzidos pela radiação UV (ultravioleta) (SOLOVCHENKO; SCHMITZ-EIBERGER, 2003; CASAGRANDE et al., 2006). Outros estudos atribuem à mesma a função de proteção contra espécies reativas de oxigênio (GRUIJL, 2002).

Vários estudos demonstram que há distintas substâncias bioativas em frutas e hortaliças, de modo que os efeitos resultantes do consumo das mesmas não podem ser atribuídos a uma substância em particular, uma vez que podem ser decorrentes de complexas interações entre várias substâncias (IACOPINI et al., 2010).

Substâncias bioativas de maçã parecem influenciar na proteção contra a proliferação de células e produção de tumor, na resposta inflamatória, na apoptose, na diferenciação celular, e na agregação das plaquetas, dentre outros efeitos (WILLIAMSON; MANACH, 2005; VEERIAH et al., 2007; HYSON, 2011). Por exemplo, a partir de um estudo *in vitro*, foi demonstrado que bioativos presentes no suco de maçã parecem proteger o intestino contra o dano celular oxidativo, em decorrência da presença de rutina, epicatequina e ácido cafeico, que atuam como agentes redutores no dano oxidativo ao DNA. Já o ácido clorogênico diminuiu de forma eficiente o nível de espécies reativas de oxigênio celular e a quercetina apresenta maior capacidade antioxidante em linhagens de células do cólon humano (SCHAEFER et al., 2006).

Em cultivo celular, os taninos derivados de maçã apresentaram efeito imunomodulador na atividade antagonista para células T que participam de respostas imunes inatas de hospedeiro contra patógenos (HOLDERNESS et al., 2007). Estudos com cobaias forneceram as primeiras evidências de que um extrato de casca de maçã fresca pode inibir a carcinogênese induzida pela irradiação ultravioleta e sugerem que este efeito pode decorrer da propriedade antioxidante do referido extrato (DING et al., 2004).

Diante disso, as diferentes substâncias bioativas presentes na maçã, isoladas ou combinadas, têm potencial prevenir ou tratar enfermidades humanas. O desenvolvimento de novos produtos, que protejam a saúde do indivíduo contra os efeitos deletérios da exposição solar, de radicais livres e de microrganismos, é uma das alternativas para agregar valor à cadeia produtiva da maçã.

3.3 Efeitos dos compostos bioativos da maçã na prevenção e no tratamento do câncer

A incidência global de câncer aumentou aproximadamente 20 % no decorrer da última década, principalmente em países de baixa e média renda. Em 2020, até 70 % do total de casos novos anuais de câncer são esperados para ocorrer em países em desenvolvimento. Ainda é difícil determinar, com exatidão, os custos e os encargos dessa morbidade ao sistema público de saúde brasileiro. Sabe-se que o investimento público em programas de prevenção do câncer de pele e detecção precoce mostram um forte potencial para benefícios à saúde e econômicos ao país (GORDON; ROWELL, 2015).

O câncer de pele é um problema crescente para os serviços de saúde, em todo o mundo, especialmente devido a sua morbidade e altos gastos com diagnóstico e tratamento. Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo (BRASIL, 2017). Dentre o total de cânceres, o de pele, tipo melanoma e não melanoma, são os mais comuns em populações de cor de pele branca com uma taxa de incidência crescente em todo o mundo, porém, com taxa de mortalidade estável (LEITER; GARBE, 2014).

O câncer de pele não-melanoma, o qual inclui o carcinoma basocelular e o carcinoma espinocelular, é o câncer mais frequente em populações de pele clara (SAMARASINGHE; MADAN, 2012). Em países como Austrália, sua prevalência está em torno de 2 % (PERERA et al., 2015). No Brasil, o não melanoma, subdividido em carcinoma basocelular ou carcinoma epidermóide, é o mais incidente no país, sendo responsável por, aproximadamente 1/5 dos casos novos de câncer. Porém, tem altos índices de cura e sua taxa de mortalidade é uma das mais baixas. Já o melanoma é responsável por aproximadamente 5% dos casos de câncer da pele, e possui uma alta letalidade, principalmente pela sua alta capacidade de desenvolvimento de metástases. Geralmente, o prognóstico para pacientes com melanoma metastático de alto risco ou avançado continua a ser ruim apesar dos avanços no campo de pesquisa para tratamento deste (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2002).

Em 2015, a taxa de incidência global de melanoma foi de 351.880 casos e foi responsável por 59.782 mortes globais (KARIMKHANI et al., 2017). No Brasil, depois de 2000, as incidências em homens e mulheres começaram a subir passando de 2,52 para

4,84 em homens e de 1,93 para 3,22 por 100.000 habitantes em mulheres (DE MELO et al., 2018). Este câncer, apesar de sua incidência ser baixa (2.920 casos novos em homens e 3.340 casos novos em mulheres) sua letalidade é elevada BRASIL, 2018), sendo o tipo mais agressivo de câncer de pele, devido à sua alta possibilidade de metástase.

As crescentes taxas de incidência provavelmente são causadas por uma combinação de aumento da exposição à radiação ultravioleta (UV), aumento de atividades ao ar livre, mudanças no estilo de se vestir, o aumento da longevidade, redução da camada de ozônio, a herança genética e, em alguns casos, a supressão imunológica (LEITER; GARBE, 2014). No Brasil, principalmente na região sul, há o predomínio da colonização por indivíduos de pele branca, descendentes de europeus, que eleva a chance dos indivíduos terem câncer de pele (ROCHA et al., 2004).

A exposição excessiva ao sol é o agente etiológico ambiental mais importante na ocorrência de câncer de pele, especialmente do tipo melanoma (FERRUCCI et al., 2014).. De acordo com o comprimento de onda, os raios ultravioletas (UV) são classificados em raios UV-A (320 nm 400nm), UV-B (280 nm 320 nm), e UV-C (100 nm 280 nm), sendo UV-C os mais nocivos em decorrência do menor comprimento de onda e consequente maior poder de penetração. Em decorrência da destruição da camada de ozônio, os raios UV-B, que estão intrinsecamente relacionados ao surgimento do câncer de pele, têm aumentado progressivamente sua incidência sobre a terra. Da mesma forma, tem ocorrido um aumento da incidência dos raios UV-C, que são potencialmente mais carcinogênicos do que os UVB (FAHLMAN; KROL, 2009). Por sua vez, os raios UVA independem desta camada, e causam câncer de pele em quem se expõe a eles em horários de alta incidência, continuamente e ao longo de muitos anos. UV é classificada como um "carcinógeno completo" porque é tanto um agente mutagênico quanto um agente prejudicial não específico e possui propriedades de um iniciador de tumor e de um promotor de tumor. Apesar de beneficiar a saúde humana através da mediação da síntese natural de vitamina D e endorfinas na pele, os raios UV tem efeitos deletérios quando suas doses são elevadas por exposição excessiva (HUSSEIN, 2005; D'ORAZIO et al., 2013).

A geração de espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species* - ROS) induzida por UV na pele desenvolve o estresse oxidativo quando a sua formação excede a capacidade de defesa antioxidante. A redução desse estresse pode ser obtida reduzindo a exposição ao UV e / ou aumentando os níveis de defesa antioxidante para evitar a produção

dos radicais. A única proteção endógena da nossa pele é a melanina e os antioxidantes enzimáticos. A melanina, o pigmento depositado por melanócitos, é a primeira linha de defesa contra a radiação UV e os consequentes danos ao DNA de células da pele, mas com limitada eficácia. Uma segunda categoria de defesa é o processo que remove ou repara as biomoléculas danificadas antes que elas possam causar alterações no metabolismo celular e consequente desencadeamento de tumor e aqui entram em atividade os antioxidantes (GODIC et al., 2014).

O dano causado pelas radiações nas estruturas celulares cutâneas, inclusive a alteração da estrutura de biomoléculas, resulta em alterações morfológicas. Até o momento, a principal estratégia para retardar o fotoenvelhecimento é a aplicação de cosméticos protetores sobre a pele e / ou a não exposição a radiações danosas. Cabe enfatizar que a pele é a primeira linha de defesa do organismo contra perturbações externas, como radiação ultravioleta, agentes químicos e mecânicos e infecção por microrganismos (PARK, 2015).

Para o melanoma, os fatores de risco incluem também fatores ambientais e genéticos. Evidências epidemiológicas mostram um risco aumentado de melanoma dentre aqueles com uma elevada exposição à radiação UV solar. Sabe-se que a taxa de melanoma quase triplicou na população americana branca nos últimos 20 anos (LONG et al., 2012). No Brasil, o câncer mais frequente é o de pele, correspondendo a cerca de 25 % de todos os tumores diagnosticados em todas as regiões geográficas e a estimativa de novos casos de melanoma em 2016 totalizou 5.670 (3 mil casos novos em homens e 2.670 em mulheres), especialmente em indivíduos da região Sul do país (BRASIL, 2017).

Tem se verificado que a exposição à radiação UV pode estar associada com aproximadamente 65 % dos casos de melanoma e 90 % dos não-melanomas (LINOS et al., 2009). Está bem estabelecido que a exposição crônica à radiação UV é uma das principais causas de câncer de pele. Estudos clínicos demonstraram que o aumento da frequência de queimaduras solares aumenta o dano ao DNA. Este dano ocorre pela formação de adutos de DNA (compostos carcinogênicos estruturalmente diversos ligam-se covalentemente ao DNA formando adutos) e/ou pela formação de radicais livres, que promovem a formação de tumores através de vários caminhos na célula (DENNIS et al., 2008; INYOUNG; YU-YING HE, 2014). Os efeitos genotóxicos diretos da radiação UV são devido à formação de fotoprodutos celulares e têm efeitos diretos sobre material genético

e efeitos indiretos mediados pelo aumento dos níveis das espécies reativas de oxigênio (LOBO et al., 2010; REIS et al., 2014). A pele contém defesas antioxidantes, que anulam os radicais livres, porém, essas defesas são superadas se a dose de radiação UV for alta o suficiente para desequilibrar o estado redox, provocando danos nos componentes celulares, como proteínas, lipídios e DNA (KIM et al., 2015). A detecção de danos no DNA tornou-se um dos temas mais importantes nos campos de pesquisa de DNA, devido ao papel crucial do DNA na mutagênese, na carcinogênese e no envelhecimento. Se a triagem rápida, econômica e sensível de novos produtos químicos *in vitro* para toxicidade potencial e antes de sua exposição ao meio ambiente em uso comercial é de grande importância (ENSAFI et al., 2015). A radiação UV-B é um dos componentes solares energéticos mais importantes que pode levar à formação de três classes principais de lesões de DNA, como dímeros de pirimidina ciclobutana (CPDs), fotoprodutos de pirimidina 6-4 pirimidona (6-4PPs), e seus Isômeros Dewar (RASTOGI et al., 2010).

Distúrbios ou danos na pele podem ser uma série ameaça à saúde do paciente ou mesmo à vida (DZIAŁO et al., 2016). A exposição solar é a principal causa ambiental do melanoma, que junto com não-melanoma, são os tipos mais comuns de câncer em populações brancas e mostram uma taxa de incidência crescente em todo o mundo, mas uma taxa de mortalidade estável ou decrescente (LEITER; GARBE, 2008). Como a radiação ultravioleta pode causar queimaduras solares, rugas, menor imunidade contra infecções, envelhecimento prematuro e câncer, há uma necessidade permanente de proteção contra a radiação UV e a prevenção de seus efeitos colaterais (KORÁČ; KHAMBHOLJA, 2011; BRASIL, 2017). A exposição solar pode ser classificada como exposição intermitente, crônica ou cumulativa, e cada uma parece ter um efeito diferente no tipo de melanoma (BERWICK et al., 2016).

O melanoma cutâneo é um tipo de câncer de pele que tem origem nos melanócitos (células produtoras de melanina, substância que determina a cor da pele) e tem predominância em adultos brancos. Segundo dados da Organização mundial da Saúde, a incidência do melanoma vem aumentando gradativamente nas últimas quatro décadas com cerca de 200 mil novos casos de melanoma por ano em todo o mundo (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2019)

Embora o câncer de pele seja o mais frequente no Brasil e corresponda a 25 % de todos os tumores malignos registrados no País, o melanoma representa apenas 4 % das

neoplasias malignas do órgão, apesar de ser o mais grave devido à sua alta possibilidade de metástase (MATATALL et al., 2013). Além disso, o melanoma é extremamente resistente às radioterapias, imunoterapias e quimioterapias e, muitas vezes, com elevado custo (TIAGO et al., 2014). Por exemplo, a vimblastina, um alcaloide, muito utilizado no tratamento quimioterápico, tem um baixo rendimento quando biossintetizado a partir da vinca-de-Madagascar (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) (VERMA et al., 2007).

Quando o melanoma passa para o estágio de metástase, o tumor adquire um perfil maligno que resulta em um prognóstico muito fraco (fase III, estágio avançado) para os pacientes (TENTORI; LACAL; GRAZIANI, 2013). As células malignas são caracterizadas por proliferação excessiva, incapacidade de se diferenciar ou realizar apoptose em condições normais e uma vida prolongada ou imortalizada (DAI; MUMPER, 2010). O melanoma cutâneo é a forma mais agressiva de câncer de pele e é caracterizado por alta taxa de metástase em órgãos como cérebro, ossos, pulmões e submucosa do intestino delgado (ZBYTEK et al., 2008).

O prognóstico desse tipo de câncer pode ser considerado bom, se detectado nos estádios iniciais, pois, em estágios avançados pode realizar metástase para outros órgãos e apresentar elevada letalidade (BRASIL, 2016). Nos últimos anos, houve uma grande melhora na sobrevida dos pacientes com melanoma, principalmente devido à detecção precoce do tumor. Porém, a estimativa de novos casos de melanoma para o ano de 2016 é de 6.230 (BRASIL, 2016). Alguns fatores de risco do melanoma são ter pele clara, exposição excessiva ao sol, história prévia de câncer de pele, história familiar de melanoma, nevo congênito (pinta escura), maturidade (após 15 anos de idade a propensão para este tipo de câncer aumenta), ter xeroderma pigmentoso (doença congênita que se caracteriza pela intolerância total da pele ao sol, com queimaduras externas, lesões crônicas e tumores múltiplos) e nevo displásico (lesões escuras na pele com alterações celulares pré-cancerosas) (INCA, 2002).

Nesse sentido, algumas evidências apresentam os antioxidantes como impedidores de danos celulares induzidos por radicais livres que estimulam a formação de células cancerígenas (REIS et al., 2014). Geralmente, os estudos mencionam a importância do consumo de alimentos ricos em antioxidantes na prevenção de doenças crônicas não transmissíveis, incluindo vários tipos de câncer, inclusive câncer de pele (CHINEMBIRI et al., 2014). Outros, sugerem que o aumento da atividade anticancerígena está

correlacionado com o aumento na quantidade de compostos de polifenólicos de um extrato e vários tipos de flavonoides promovem a apoptose em células cancerígenas (TUNG MUNNITHUM et al., 2018).

Por exemplo, extratos de antocianina e antocianidinas de mirtilo inibem significativamente a viabilidade e proliferação de células de melanoma B16-F10 e induziram apoptose celular (WANG et al., 2017). Além disso, os fenólicos podem inibir a formação e o crescimento de tumores por regulação do ciclo celular e/ou estimulação de apoptose celular. Os fenólicos podem atuar bloqueando algumas proteínas do ciclo celular do desenvolvimento do câncer, tais como ciclinas e ciclinas dependentes ou induzindo a expressão gênica de p21, p27 e p53 (DAI; MUMPER, 2010).

Os polifenóis do chá verde contêm uma mistura natural de monômeros de epicatequina foram testados no crescimento de células de câncer de melanoma e o mecanismo molecular subjacente a esses efeitos usando diferentes linhas celulares de melanoma humano como um modelo *in vitro*. O tratamento de linhas celulares de melanoma (A375, Hs294t, SK-Mel28 e SK-Mel119) com eles inibiu significativamente a viabilidade celular bem como a capacidade de formação de colônias de células de melanoma de um modo dependente da dose. Esses efeitos foram associados a uma inibição significativa da atividade da histona desacetilase, redução nos níveis de proteínas classe I, aumento da atividade da histona acetiltransferase e indução de danos no DNA, como detectado pelo ensaio cometa, em melanoma células (PRASAD; KATIYAR, 2015).

Antioxidantes como os compostos fenólicos desempenham o papel principal no combate contra as espécies de radicais livres que são a principal causa de numerosas mudanças negativas da pele, incluindo o melanoma (KORAĆ; KHAMBHOLJA, 2011). Eles atuam de forma protetora ou atenuam a progressão de certos distúrbios da pele (por exemplo, rugas, acne) e câncer de pele (DZIAŁO et al., 2016). A estrutura aromática dos fenólicos é a característica significativa do stress oxidativo, nomeadamente na prevenção da formação e eliminação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) (DZIAŁO et al., 2016). Experimentos *in vitro* e *in vivo* demonstram que estes compostos atuam prevenindo ou reduzindo o melanoma.

É relevante mencionar que o estudo de compostos agrupados, diferente do estudo de individualizado de compostos, é importante para avaliar sinergismo e antagonismo entre os mesmos. Geralmente uma combinação de diferentes fenólicos exerce melhor efeito

antioxidante e anticancerígeno no melanoma do que um determinado fenólico individualmente (DAI; MUMPER, 2010) e isso também acontece em outros tipos tumor (DRIGLA, et al., 2016). A ação sinérgica entre fenólicos ou a ação sinérgica entre fenólicos e fármacos pode inibir ou reverter o processo de formação de tumor. Há compostos que exibem atividade biológica quando agrupados com distintos compostos, mas quando testados isoladamente perdem atividade, total ou parcialmente. Os polifenóis interagem de forma aditiva, sinérgica ou antagonicamente não apenas com outros fenólicos (LEWANDOWSKA et al., 2014). Como exemplo, a quercetina apresenta propriedades protetoras contra a formação de câncer e sua progressão e possui diferentes efeitos sinérgicos e antagônicos de sua atuação biológica anti-metastática (ASENSI et al., 2011).

3.4 Efeitos dos compostos bioativos da maçã contra microrganismos

A contaminação por microrganismos deteriorantes e / ou patogênicos e a oxidação de alimentos podem comprometer suas características sensoriais (aroma, cor, sabor e textura) e nutricionais, e ainda produzir substâncias citotóxicas e genotóxicas, deletérias para a saúde humana (SOHAIB et al., 2017). A deterioração de alimentos pela ação de microrganismos pode manifestar-se pelo crescimento visível (mofo, colônias), e por alterações texturais (degradação de polímeros), de aroma (*off-odor*) e sabor (*off-flavor*) (GRAM et al., 2002), além de apresentar maior risco de ocorrência de infecção e/ou intoxicação alimentar (RAWAT, 2015).

Variedades de maçã com maior teor de compostos fenólicos podem ter maior atividade antimicrobiana. Portanto, os extratos que concentram os polifenóis são interessantes para testar sua ação contra microrganismos (ALBAYRAK et al., 2010). Agentes antimicrobianos, incluindo conservantes de alimentos, têm sido usados para inibir bactérias transmitidas por alimentos e para estender a vida útil dos alimentos processados. Muitos extratos de plantas, ervas e especiarias possuem propriedades antimicrobianas e podem ser usados como fonte de agentes antimicrobianos para controlar o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis em alimentos (ALBAYRAK et al., 2010; BAGAMBOULA et al., 2003).

Os polifenóis são compostos do metabolismo secundário da planta que podem se acumular em certos órgãos vegetais, como folhas, frutos, raízes e hastes. Eles têm diversas

funções biológicas, inclusive na defesa contra microrganismos patogênicos e herbívoros (VOGT, 2010; OLIVEIRA; CARVALHO; MELO, 2014).

Em alimentos, a bactéria *Escherichia coli* é a principal causadora de diarreia em países em desenvolvimento, já a bactéria *Salmonella* é a mais comuns dentre os patógenos transmitidos por alimentos, principalmente através da carne, aves, ovos e leite (WHO, 2013).

Outra bactéria de grande preocupação na indústria alimentícia é a *Listeria monocytogenes*. Ela é onipresente no ambiente e potencialmente um enteropatógeno causador da listeriose (DAVID; COSSART, 2017).

Staphylococcus aureus é um importante patógeno humano que causa uma ampla gama de infecções clínicas como bacteremia e endocardite infecciosa, bem como infecções osteoarticulares, cutâneas e dos tecidos moles e pleuropulmonares (TONG et al., 2015). As infecções podem variar desde lesões superficiais da pele, passando por abscessos profundos até sepses potencialmente letais (POLLITT et al., 2018).

Muitos fenóis de plantas são conhecidos por possuírem propriedades antimicrobianas, por isso podem alterar a composição da flora do cólon de maneira positiva (PUUPPONEN-PIMIÄ et al., 2001; KOUTSOS; TUOHY; LOVEGROVE, 2015), sendo potencialmente passíveis de serem empregados como agentes antimicrobianos em alimentos.

Extratos fenólicos de frutas e fenólicos sintéticos são utilizados nas indústrias de alimentos, fármacos e cosméticos como antioxidantes e eventualmente com outras funções. A adição direta de fenólicos e de outros compostos naturais aos alimentos é o método mais comum de aplicação, sendo que em regra os alimentos são imersos, pulverizados ou revestidos com soluções contendo os referidos extratos, antes de serem embalados (LUCERA et al., 2012). Outra estratégia de adição de compostos nos alimentos é pela encapsulação, técnica que facilita a manutenção da estabilidade a longo prazo, reduzindo degradação desses compostos naturais muito sensíveis à luz e ao calor, além de melhorar a biodisponibilidade deles, principalmente devido à baixa solubilidade em água (MUNIN; EDWARDS-LÉVY, 2011).

Há vários relatos sobre a eficácia de extratos de frutas no controle de microrganismos. Filmes de quitosana incorporados com várias concentrações de ácido gálico aumentaram a atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *S. enterica* ser.

Typhimurium, *Listeria innocua* e *Bacillus subtilis* (SUN et al., 2014). Extratos de casca de mangostão e pericarpo de frutas contêm misturas de compostos fenólicos com atividade contra bactérias Gram-positivas, notadamente *Listeria monocytogenes* (PALAKAWONG et al., 2013). Frutos, como o *Crataegus oxyacantha* L. (*Rosaceae*), rico em fenólicos (2,12 mg GAE.g⁻¹ a 30,63 mg GAE.g⁻¹) apresentaram potencial antimicrobiano contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella spp.*, *Aspergillus niger* e *Candida albicans* (KOSTIC et al., 2012).

3.5 Efeitos dos compostos da maçã na redução da glicemia

A Diabetes Mellitus é considerada uma doença crônica que ocorre quando o pâncreas não é mais capaz de produzir insulina, ou quando o corpo não consegue fazer bom uso da insulina que produz para auxiliar a entrada da glicose nas células. Não ser capaz de produzir insulina ou usá-la efetivamente leva a níveis elevados de glicemia que estão associados a danos no corpo e à falência de vários órgãos e tecidos como coração, rim, nervos e olhos (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2017). É considerada um distúrbio metabólico multifatorial caracterizado por concentrações de glicose plasmática em jejum maior do que 126 mg/dL, ou acima de 200 mg/dL em qualquer momento do dia (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2005; ZENDJABIL, 2016).

As complicações agudas da Diabetes Mellitus incluem: hipoglicemia, cetoacidose diabética, estado hiperosmolar hiperglicêmico, coma diabético hiperglicêmico, convulsões ou perda de consciência e infecções. Não menos graves, suas complicações crônicas incluem: nefropatia, neuropatia e retinopatia, doença cardíaca isquêmica, acidente vascular cerebral e doença vascular periférica, encefalopatia diabética e pé diabético (FOROUHI; WAREHAM, 2014).

A Federação Internacional de Diabetes estima que no ano de 2045 existirão mais de 628 milhões de adultos entre 20 anos e 79 anos com a doença. O Brasil, o sexto país mais populoso do mundo, atualmente com 210 milhões de habitantes, está em quarto lugar em ocorrências de Diabetes, com 12 milhões de adultos diagnosticados com a doença, e com previsão de aumento para 20 milhões de diabéticos até o ano de 2045 (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2017).

O Diabetes Mellitus é uma das principais ameaças à saúde humana devido a sua crescente prevalência, o seu curso crônico e suas complicações incapacitantes, sendo que

o controle da hiperglicemia pós-prandial e a inibição do estresse oxidativo são fundamentais no tratamento do diabetes (CHEN et al., 2009).

O aumento súbito nos níveis de glicose no sangue (hiperglicemia), comum na diabetes tipo II, ocorre devido à rápida absorção de açúcares simples pela circulação porta. Mesmo em dietas com redução de açúcares simples, os mesmos podem resultar da hidrólise de amido. O amido, hidrolisado pela α -amilase salivar e pancreática dá origem a mono e oligossacarídeos, que são posteriormente hidrolisados por α -glicosidases intestinais produzindo unidades de glicose que serão absorvidas pelo organismo. Assim, a inibição destas enzimas é estratégia eficaz para o manejo da doença.

Alternativas para reduzir a hiperglicemia pós-prandial são de interesse crescente a fim de reduzir o risco e a progressão do diabetes. Os tratamentos existentes consistem na ingestão de medicamentos hipoglicemiantes, em dietoterapia e uso de insulina. Uma das estratégias terapêuticas é diminuir os níveis de glicose plasmática pós-prandial por inibição da hidrólise de dissacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos (amido ou glicogênio); para assim reduzir a disponibilidade de monossacarídeos. Em parte, isto poderia ser feito pela inibição das enzimas α -amilase e α -glicosidase, presentes na borda da escova do intestino delgado (SALES et al., 2012; RASOULI et al., 2017).

As terapias antidiabéticas atuais são baseadas em drogas sintéticas que, frequentemente, promovem efeitos colaterais (VINAYAGAM et al., 2016). O uso de inibidores de α -glicosidase, como acarbose e miglitol, podem causar distúrbios intestinais, como diarreia, dor intestinal e flatulência (FUJISAWA et al., 2005). A busca por compostos naturais para atuar como coadjuvante no tratamento da resistência insulínica ou na substituição de fármacos específicos para redução da glicemia tem sido alvo de inúmeras pesquisas (VINHOLES et al., 2017; VINHOLES; VIZZOTTO, 2017).

O risco de desenvolver diabetes tipo 2 pode ser reduzido pela mudança dos padrões alimentares, atividade física e, particularmente, pelo maior consumo de frutas e hortaliças (LIN et al., 2016). O consumo de frutas e hortaliças, alimentos ricos em compostos fenólicos, tem sido associado a dietas saudáveis e à prevenção de doenças crônicas, devido às propriedades antioxidantes desses compostos, que atuam como agentes quelantes com ação redutora, como doadores de hidrogênio e inibidores de oxigênio singlete (TSAO; YANG, 2003). Além disto, há algumas evidências que sugerem que os compostos fenólicos podem prevenir doenças, não apenas pela ação antioxidante,

mas também através de mecanismos de sinalização celular, indução de expressão gênica e modulação de atividade enzimática (MILENKOVIC et al., 2011). Neste contexto, metabólitos secundários, inclusive fenólicos, têm sido extensivamente testados na inibição da enzima α -amilase, assim como da α -glicosidase, como alternativa para regular o metabolismo de carboidratos e a hiperglicemia (RASOULI et al., 2017).

A α -amilase (1,4- α -D-glicano glicanoidrolase) atua aleatoriamente sobre ligações glicosídicas α -1,4 da amilose e da amilopectina presentes no amido, produzindo uma mistura de glicose, maltose e dextrinas. Já a α -glicosidase, localizada na superfície da borda da escova intestinal, é responsável pela hidrólise maltose, liberando duas moléculas de glicose para serem absorvidas na corrente sanguínea (WILLIAMSON, 2013) (Figura 8).

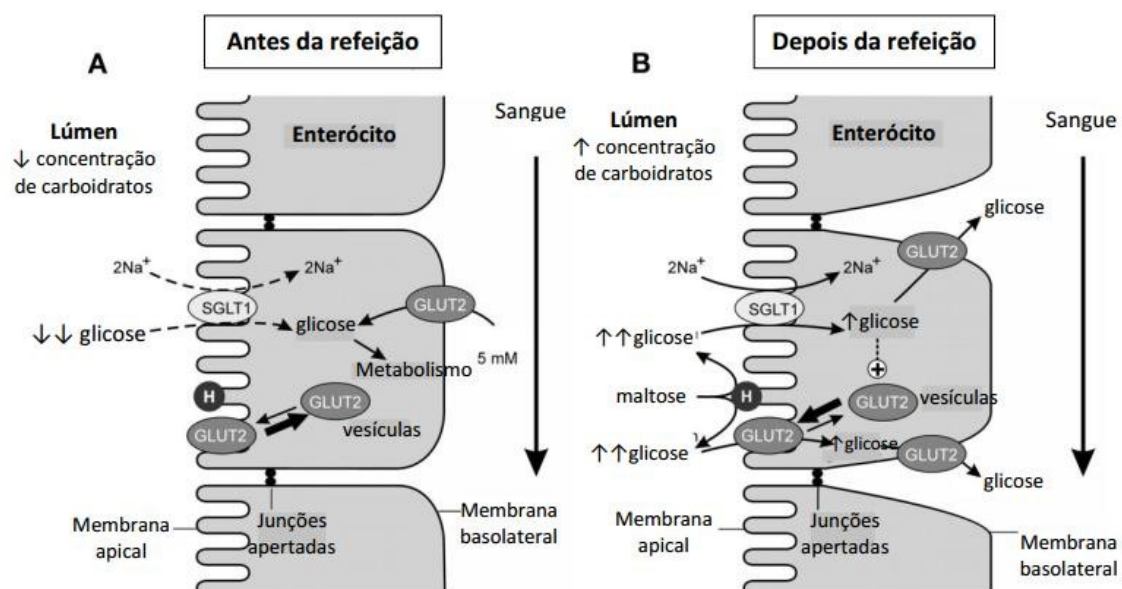


Figura 8. Regulação da absorção da glicose antes e após a refeição H – hidrolase (α -glicosidase). Fonte: adaptado e traduzido de Kellet; Brot-Laroche, 2005.

Os alimentos funcionais ricos em polifenóis têm sido propostos em tratamentos suplementares e nutracêuticos únicos para o Diabetes Mellitus. Em revisão de literatura, Rasouli et al. (2017) elenca vários polifenóis inibidores da enzima α -glicosidase: ácido cafeico, curcumina, cianidina, daidzeína, epicatequina, eridictiol, ácido ferúlico, hesperetina, narenginina, pinosresinol, quercetina, resveratrol e ácido sirárico.

Segundo Zaklos-Szyda et al. (2015) a atividade de polifenóis está relacionada com a recuperação de defesas antioxidantes, restauração de mecanismos secretores de

insulina em células pancreáticas, ou com a inibição da atividade de enzimas hidrolisantes de carboidratos. A utilização de polifenóis como fonte de moléculas bioativas, para serem utilizados em substituição a fármacos convencionais, tem sido investigada (ADYANTHAYA et al., 2010), e se justifica pela elevada produção e comercialização mundial (CORNILLE et al., 2015).

Os polifenóis, especialmente flavonoides, ácidos fenólicos e taninos, têm a importante propriedade de inibir a α -glicosidase e a α -amilase, que são enzimas responsáveis pela digestão de carboidratos da dieta e consequente acúmulo do monossacarídeo glicose. Polifenóis vegetais e produtos ricos em polifenóis modulam o metabolismo de carboidratos e lipídios, atenuam a hiperglicemia, dislipidemia e resistência à insulina, melhoram a função das células β , estimulam a secreção de insulina, melhoram o metabolismo do tecido adiposo e aliviam o estresse oxidativo e processos inflamatórios. Eles também podem prevenir o desenvolvimento de complicações do diabetes a longo prazo, incluindo doença cardiovascular, neuropatia, nefropatia e retinopatia (LIN et al., 2016).

Há vários relatos científicos caracterizando o potencial terapêutico de polifenóis na prevenção e tratamento de distúrbios no metabolismo de carboidratos em seres humanos e animais. Segundo Knekt et al. (2002), a maior ingestão de quercetina, um dos principais componentes de cascas de maçã, reduz o risco de diabetes tipo II. Segundo Tan et al. (2013), extrato de folhas de *Gynura medica*, rico em flavonóis e ácidos fenólicos, apresentou atividade hipoglicêmica contra ratos diabéticos. Quercetina, campeferol-3-O- β -D-glucopiranosídeo, campeferol-3-O-rutinosídeo, rutina e ácido caféico mostraram boa atividade inibidora da α -glicosidase de levedura com valores IC_{50} de 1,67 mg/mL, 1,46 mg/mL, 0,38 mg/mL, 0,10 mg/mL e 0,53 mg/mL, respectivamente.

Citando estudos já publicados, extratos de *Genus Artemisia*, uma planta medicinal, rica em ácido cafeico inibiu α -amilase (IC_{50} = 150,24-384,14 μ g / mL) e α -glicosidase (IC_{50} = 214,42-754,12 μ g / mL) (OLENNIKOV et al., 2018). Extratos de semente de uva, de chá verde e chá branco, além de seus monômeros flavan-3-ol (catequinas) foram avaliadas sobre a atividade da α -amilase e α -glicosidase. O extrato de semente de uva inibiu fortemente a atividade da α -amilase e α -glicosidase muito mais efetiva que a acarbose. As catequinas individuais eram inibidores potentes da α -glucosidase (YILMAZER-MUSA et al., 2012). Extratos de batata inglesa de polpa roxa mostraram inibição de α -amilase, α -

glicosidase com valores de IC₅₀ 25 e 42 µg / ml, respectivamente (KALITA ET AL., 2018). Extrato de *Physalis peruviana* apresentou inibição apenas para α-amilase (IC₅₀: 619,9 g / mL) (REY; OSPINA; ARAGÓN, 2015). Extratos etanólicos das folhas de *Camellia sinensis* e de *Eugenia uniflora* foram efetivos na inibição da α-glicosidase, *E. uniflora* foi quase 40 vezes mais ativa que *C. sinensis* (VINHOLES; VIZZOTTO, 2017). Frutas nativas colombianas ricas em ácido clorogênico apresenatram forte inibição contra α-amilase e α-glicosidase (LOIZZO et al., 2019).

A digestão, absorção e metabolismo dos carboidratos podem ser influenciados pelos polifenóis da dieta e seus metabólitos. A maioria dos carboidratos é digerida no trato gastrointestinal superior a monossacarídeos que são então absorvidos pela circulação. A elevada concentração de glicose no sangue promove a secreção de insulina das células β das ilhotas de Langerhans no pâncreas, e a insulina média a captação de glicose nos tecidos periféricos, incluindo músculo, tecido adiposo e rim, promove o armazenamento de glicose no fígado como glicogênio e inibe a lipólise no tecido adiposo. Já o glucagon, é secretado pelas células α pancreáticas quando a glicemia diminui, promove a produção de glicose no fígado, induzindo a glicogenólise e a gliconeogênese para garantir glicose circulante adequada para alimentar as funções corporais (HANHINEVA et al., 2010).

A maçã por ser uma importante fruta no consumo da população, em um estudo de intervenção com indivíduos, aumentou a capacidade antioxidante do plasma e os níveis de ácido úrico, mas sem evidência disto ser relacionado somente aos compostos fenólicos (LOTITO; FREI, 2004). Estes compostos estão descritos na literatura como fitoquímicos que combatem ou previnem doenças, especialmente as doenças crônicas não transmissíveis. Por exemplo, a quercetina-3-O-ramnosídeo, floridizina e ácido 5-cafeoilquínico derivados de extratos de maçã, podem contribuir com 26 e 12%, respectivamente, para a atividade inibitória da glicose, tanto a captação celular quanto o transporte basal de glicose em experimento *in vitro*, sendo que o GLUT2 é o principal alvo da superfície apical dos compostos de maçã, e a ausência de sódio, que impede a atividade da transportador de glicose dependente de sódio 1 (SGLT1), não afeta muito o padrão de inibição. O ácido 5-cafeoilquímico e o ácido p-cumárico também demonstraram alguma inibição e todos compostos mostraram inibição, dependente de dose (MANZANO; WILLIAMSON, 2010).

Diferentes estudos epidemiológicos, muitos com corte transversal e alguns de coorte, demonstram que o consumo de maçã diminui o risco de desenvolvimento de Diabetes. Uma revisão de literatura compilou diversos destes e os autores relataram que o consumo de maçã ou de frutas ricas em compostos fenólicos reduz sim o risco de diabetes mellitus, inclusive com a síntese da regulação e homeostase da glicose no organismo e os efeitos dos fenólicos no equilíbrio deste (KIM; KEOGH; CLIFTON, 2016). Porém, alguns demonstram que nenhum dos flavonóis totais e flavonas, ou quercetina, kaempferol, miricetina, apigenina e luteolina foram significativamente associados com o menor risco de DM₂ (SONG et al., 2005).

Por outro lado, informações sobre a redução da glicemia, especialmente pela inibição de enzimas relacionadas à digestão dos carboidratos. α -glicosidase e α -amilase são enzimas chave para controle glicêmico, pois são responsáveis pela digestão dos carboidratos da dieta em glicose e se tornam alvos precisos para melhor controle glicêmico após refeições com alto teor de carboidratos pois reduzem a taxa de liberação e absorção de glicose no intestino delgado e conseqüentemente suprimem a hiperglicemia pós-prandial (HANHINEVA et al., 2010). Um estudo de revisão compilou as informações de que os polifenóis da dieta podem inibir a α -amilase e α -glicosidase, inibir a absorção de glicose no intestino pelo SGLT1, estimular a secreção de insulina e reduzir a produção de glicose hepática. Eles também podem aumentar a captação de glicose dependente de insulina, ativar a proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina, modificar o microbioma e ter efeitos antiinflamatórios todos relacionados com a melhora do quadro do diabetes (KIM; KEOGH; CLIFTON, 2016).

Ross et al. (2015), trabalhando com maçã cv. gala, realizaram a extração e purificação de polissacarídeos solúveis em água e determinaram o efeito inibitório destes na enzima α -glicosidase. Os polissacarídeos isolados, após digestão gastrointestinal simulada, na concentração de 5 mg/mL, tiveram efeito inibitório (20 % - 30 %) sobre a enzima α -glicosidase. Estes resultados evidenciam que metabólitos primários de maçã também apresentam potencial para tratar e controlar o diabetes tipo 2 via controle da hiperglicemia pós-prandial por retardo na absorção de glicose.

Polifenóis de maçã têm sido descritos como agentes hipoglicemiantes. Conforme relatado por Bouderbala et al. (2016), ratos Wistar submetidos a dieta hiperlipídica tiveram diminuição, mais de 26 %, nos níveis séricos de glicose ao serem alimentados com vinagre

de maçã, naturalmente contendo polifenóis. Outro estudo experimental demonstrou o efeito protetor da suplementação de suco de maçã e extrato de casca de maçã em ratos Wistar albinos diabéticos contra as complicações deletérias do Diabetes Mellitus. Com a suplementação por 21 dias foi possível verificar uma diminuição significativa na atividade de enzimas antioxidantes pancreáticas e uma diminuição significativa na glicemia de jejum (FATHY; DREES, 2016).

Acredita-se que os florentina- O- glicosídeos, a floretil-2'- O -glucósido e a floretil-2'- O- (2- O- xilosil) glicosídeo, sejam exclusivos para maçãs e produtos de maçã. Seu papel na inibição de transportadores de glicose dependentes de sódio no lúmen intestinal é comprovado com ênfase especial para a floretina-2'- O -glucósídeo. Ao diminuir a absorção de glicose, a floretina-2'- O -glucósídeo pode, portanto, reduzir os níveis glicêmicos pós-prandiais, e acredita-se que essa ação possa ser benéfica para o tratamento do Diabetes Mellitus. Os autores sugeriram um papel interessante para os polifenóis da maçã relacionados ao controle da glicose no diabetes (FRANCINI; SEBASTIANI, 2013).

Os polifenóis da dieta também afetam a glicose periférica absorvida nos tecidos sensíveis à insulina e não sensíveis à insulina. Estudo realizado com alcaloides (berberina e arecolina) e fenólico (ácido vanílico), demonstrou que estes compostos podem induzir redução na expressão das enzimas envolvidas na síntese de ácidos graxos e colesterol, e consequentemente ajudar a prevenir as complicações secundárias do diabetes (PRABHAKAR; DOBLE, 2011).

Outro estudo demonstrou que dietas enriquecidas com extratos da fruta *Momordica charantia* resultaram em aumentos na captação de glicose, melhora no transporte de glicose (GLUT-4), regulação positiva do receptor ativador-proliferador de peroxissoma gama (PPAR) e da fosfatidilinositol-3 quinase, que é ativada no transporte de glicose mediada por insulina (PI3K) (KUMAR et al., 2009).

Outros estudos sugerem que o ácido clorogênico pode interferir na absorção de glicose no intestino pela inibição de transportadores de glicose dependentes de Na⁺, SGLT1 e SGLT2, além de melhorar a função endotelial em indivíduos com hipertensão estágio 1, e reduzir o estresse oxidativo grave induzido por hiperglicemia transitória em pacientes diabéticos tipo 2 (JOHNSTON K.L., CLIFFORD M.N., MORGAN, 2003; YOONA; KEOGH; CLIFTON, 2016).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material Experimental

Amostras de maçã (*Malus domestica* Borkh cv. Gala) foram obtidas de pomar comercial da Empresa Randon Agrosilvopastoril S.A. (RASIP), da região produtora de Vacaria (50°56' 02" W, 28° 30' 44" S), RS, colhidas no mês março de 2014.

4.1.1 Colheita, armazenamento e transporte

Foram selecionadas maçãs com as seguintes características: firmeza da polpa de 0,454 Kg/cm² (Effegi com sonda de 11 mm de diâmetro), teor de amido de 2,0 a 3,0, de acordo com a escala de 1 a 5 elaborada por Werner (1989), sólidos solúveis totais (SST) de 5,2 °BRIX a 6,0 °BRIX, acidez titulável (ATT) de 5,2 cmol/L⁻¹ a 6,0 cmol/L⁻¹ e com coloração vermelha (GIRARDI; BENDER, 2003). As mesmas foram selecionadas sem injúrias mecânicas, de tamanho pequeno (CAT 3), lavadas em água corrente para retirada de sujidades. Após a fruta foi armazenada em câmara fria até o momento do experimento.

As amostras de maçã foram analisadas nos laboratórios da Embrapa Clima Temperado e no Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial (DCTA) da UFPel, RS. Para o transporte do local de origem até Pelotas foram utilizadas embalagens limpas de papelão para não contaminar e não danificar as frutas. Para o armazenamento, em câmaras refrigeradas da Embrapa, onde as frutas foram mantidas a 1,0°C de temperatura, com umidade relativa de 90,0 ± 5,0 % (GIRARDI; BENDER, 2003).

Foram selecionadas frutas na categoria 3, pois elas podem conter até 4 defeitos como dano, lesão, manchas, queimadura e/ou rachaduras. A ideia é que a fruta que contém danos ou que sofreu stress pode ter produzido maior teor de compostos bioativos para sua defesa.

4.2 Métodos

Foram utilizadas células SK-Mel-103 de melanoma humano, B16F10 de murino e MRC5 de fibroblastos humanos (Clonetics-Cambrex-Lonza, EUA) são incubadas em estufa a 37°C, 95% de umidade e 5% de CO₂ até atingirem estágio de subconfluência (~80%).

Meios de cultura para as células: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com soro fetal bovino (SBF) a 10% e solução de antibióticos 1% (penicilina 10.000u/mL e estreptomicina 10.000µg/mL). Todas as linhagens foram adquiridas no Banco Células do Rio de Janeiro.

Os microrganismos *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (ATCC 14028) foram obtidos da coleção de bactérias do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Agroindustrial. Ciência e Tecnologia (DCTA) na UFPel. Para o cultivo das bactérias foram utilizados os meios de cultivo: *Brain Heart Infusion* (BHI - Acumedia ®), Cromogênico (CR - Oxoid ®), Baird - Parker (BP - Oxoid ®), Manitol Lisina I Violeta Verde Brilhante (MLCB - Oxoid ®), EMB (Eosina Metileno Azul - Oxoid ®) e Mueller - Hinton (MH - Oxoid ®).

Foram utilizados os seguintes reagentes, todos com pureza compatível com cada uma das análises e adquiridos de fabricantes idôneos: metanol, ácido clorídrico, hidróxido de sódio, acetona, etanol, dimetil sulfoxido (DMSO), acetato de etila, acetonitrila, reagente Folin-Ciocalteu, 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), carbonato de sódio, ácido clorogênico, acetonitrila, ácido clorídrico, etil acetato, ácido cítrico, fosfato dissódico hidrogênio, fosfato dipotássico hidrogênio, tripsina, EDTA, 3,4,5 dimethylthiazol-2, 5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT) e Agarose.

Os cartuchos utilizados foram Sep-Pak C18 35 cc Vac, em dimensão de 10 g de fase estacionária ou adsorvente por cartucho, tamanho das partículas 37-55 µm (Part number WAT043345, Waters Association, Milford, MA).

4.2.1 Obtenção do extrato bruto

As frutas foram retiradas da câmara fria e encaminhadas para a produção de extratos hidroacetoetanólicos. Cerca de 1 Kg de fruta por etapa foram utilizadas para a preparação de extratos brutos. As frutas inteiras (casca, polpa e semente) foram picadas em fatias finas de 3mm, em média, e logo foi adicionado a solução extratora composta de acetona:etanol 30:70, em proporção de 1:3. Em seguida as amostras foram homogeneizadas em ultraturax (Marconi) e centrifugadas a 3000 g, por 25 min, a 0°C (Eppendorf 5810 R). Os extratos brutos foram filtrados e concentrados em rotaevaporador

à vácuo (Rotavapor® R II Marca Buchi) por 90 min a 40°C. Até o momento da purificação e do fracionamento estes extratos foram armazenados gelo (0 °C).

4.2.2 Obtenção das frações e do extrato purificado

Os extratos brutos obtidos de maçã foram purificados e fracionados por extração em fase sólida (SPE) em colunas de fase reversa (apolares), as quais separam analitos com base na sua polaridade e minimizam o risco de degradação fenólica na unidade experimental (MICHALKIEWICZ et al., 2008). Os cartuchos C18 pré-condicionados (metanol e água) sob pressão (10mmHg) foram carregados com o extrato bruto e lavados com água pH 7.0 para remover açúcares, ácidos orgânicos e outros componentes solúveis em água. Os compostos fenólicos foram, em seguida, eluídos com diferentes solventes com ou sem ajustamento do pH da amostra, conforme a família de compostos fenólicos alvo (OSZMIANSKI et al., 1988).

A purificação e o fracionamento estão demonstrados nas figuras 9 e 10, respectivamente. Para o extrato purificado foi utilizado apenas um cartucho. Este foi condicionado com 50mL de metanol 95% ajustado com NaOH 0,1N a pH 7.0 e após 50mL de água osmose reversa e ajustada a pH7.0. O extrato bruto diluído em água osmose reversa em 1:5, ajustado a pH7.0, foi carregado no cartucho. O cartucho foi lavado com água pH 7.0. A eluição dos compostos fenólicos foi realizada com 50 mL de metanol 95% a pH 7.0 eluindo, assim, o extrato purificado. Para o fracionamento foram utilizados dois cartuchos, conforme segue: O primeiro cartucho foi condicionado com metanol e água, conforme descrito anteriormente. O extrato bruto diluído foi carregado no cartucho. Neste caso, o resíduo do extrato bruto carregado foi coletado para uso posterior (e obtenção da fração I). A eluição das frações teve início com acetonitrila 16% pH2 (fração II), contendo, principalmente, antocianinas monoméricas. Na sequência, foi utilizado 50mL de acetato de etila (fração III), eluindo, principalmente, flavonoides. Por fim, foi utilizado metanol 95% dando origem a fração IV (principalmente antocianinas poliméricas). Um segundo cartucho foi condicionado, com 50mL de metanol 95% e 50mL de água osmose reversa (pH 2.0 para ambos) e o resíduo do primeiro cartucho usado no fracionamento teve seu pH ajustado para 2.0 e foi carregado. Para eluir esta fração rica, principalmente, em ácidos fenólicos, (Fração I) foi utilizado metanol 95%.

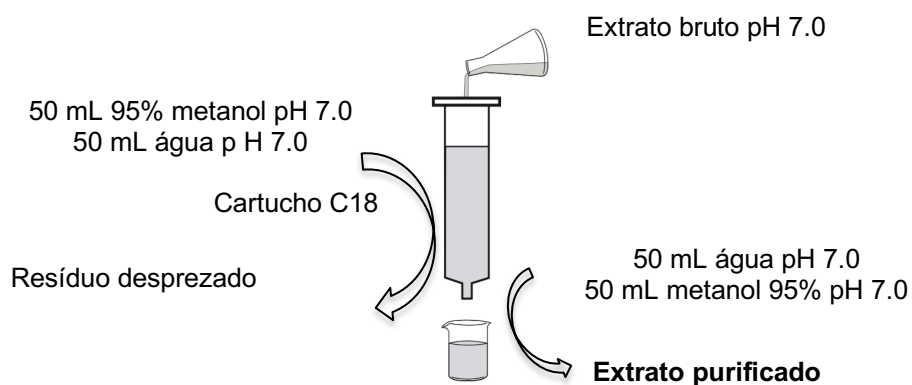


Figura 9. Diagrama de fluxo de purificação de extratos de hidroacetoetanólicos de maçã (*Malus domestica* Borkh cv. Gala).

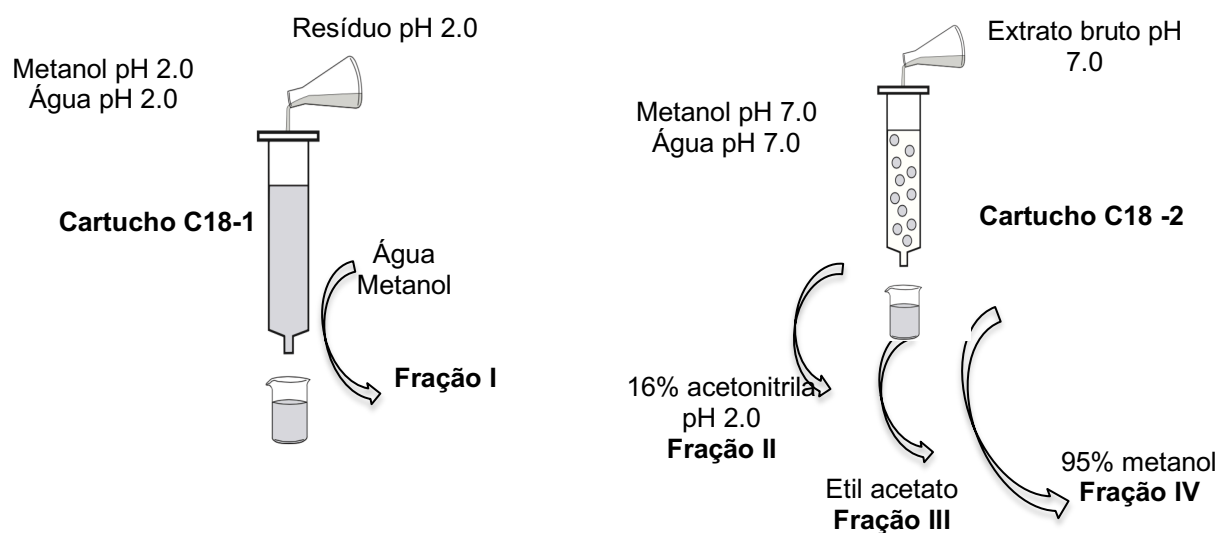
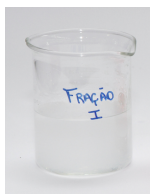


Figura 10. Diagrama de fluxo de fracionamento de extratos hidroacetoetanólicos de maçã cv. Gala (*Malus domestica* Borkh).

Na Tabela 1 são apresentadas características de obtenção e de composição esperada do extrato purificado e das frações.

Tabela 1. Características de obtenção e de composição esperada do extrato purificado e das frações obtidas de maçã cv. Gala por extração em fase sólida.

UNIDADE EXPERIMENTAL	SOLVENTE DE ELUIÇÃO	FIGURA	COMPOSTOS ESPERADOS
Extrato purificado	Metanol 95% pH 7.0		Compostos fenólicos
Fração I	Metanol 95% pH 2.0		Ácidos fenólicos
Fração II	Acetonitrila 16% (acetonitrila e água osmose reversa) pH 2.0		Antocianinas monoméricas
Fração III	Acetato de metila		Flavonols
Fração IV	Metanol 95%		Antocianinas poliméricas

Após obtenção do extrato bruto, 1 kg de maçã rendeu aproximadamente 3,0 L de sobrenadante do extrato. Após a rotaevaporação restaram 178,5 mL de extrato bruto, quantidade esta que foi dividida em quatro porções para realizar a extração por SPE. Com

o carregamento desse extrato no cartucho foi possível fazer a eluição de 100 mL de extrato purificado, 50 mL de Fração I, 50 mL de Fração II, 50 mL Fração III e 50 mL da Fração IV. Após nova rotaevaporação e liofilização o rendimento foi de, em massa seca: 0,45 g da Fração I, 0,39 g da Fração II, 0,46 g da Fração III, 0,39 g da Fração IV e 0,60 g do Extrato Purificado.

As etapas de obtenção de extrato bruto, extrato purificado e das frações foram realizadas no Laboratório da Sede da Embrapa Clima Temperado, em Pelotas, RS.

4.2.3 Identificação de compostos fenólicos individuais

Depois de obtido o extrato purificado e as frações, os compostos encontrados foram identificados através de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) (LIN et al, 2008 e ZHANG, LI; CHENG, 2010), uma técnica mais confiável, rápida, precisa e útil para separar e identificar fenólicos (RANA; BHUSHAN, 2016).

Para o *screening* de outros fenólicos presentes nos extratos foi utilizada a metodologia por cromatografia acoplada a um detector de arranjo de diodos e espectrômetro de massas (CLAE-DAD-EM) (LIN; HARNLY, 2007). Os extratos já purificados foram rotulados, identificados e guardados em ultra-freezer (-35 °C) para sua conservação. O extrato e frações foram dissolvidas em 1,0 mL de metanol : água (80:20, v/v) para as análises. O instrumento CLAE-DAD-EM consiste em um cromatógrafo líquido acoplado a um detector de arranjo de diodos (DAD) e espectrômetro de massas (EM). Foi utilizada uma coluna C18, com temperatura de operação ajustada para 25 °C. O detector (DAD) foi ajustado para 350 nm, 310 nm, 270 nm e 520 nm. Os espectros de massas são obtidos simultaneamente nos modos de ionização química positiva e negativa (PI e NI) a voltagens de fragmentação de 100 V e 250 V, respectivamente, para uma faixa de massas de 100 Da - 2000 Da. O método permite a obtenção simultânea de cromatogramas de absorção UV/vis e TIC (*Total Ion Current*). Em qualquer tempo um espectro completo UV/Vis (190 nm - 650 nm) ou espectro de massas (100 Da - 2000 Da) de um pico pode ser verificado. Também foi obtido o tempo de retenção e comprimento de onda de máxima absorção dos compostos. A identificação positiva e negativa foi feita por comparação dos dados da amostra com padrões ou com dados de compostos de amostras previamente

identificadas na literatura. Esta etapa de caracterização foi realizada na Embrapa Agroindústria Tropical em Fortaleza, CE.

4.2.4 Atividades biológicas das frações e do extrato purificado

4.2.4.1 Atividade antioxidante, conteúdo total de fenólicos e de antocianinas

A atividade antioxidante do extrato purificado e das frações foi medida pelo método de sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) conforme Brand-Williams et al. (1995). O método baseia-se na transferência de elétrons onde, por ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar, radical de nitrogênio orgânico estável, com um elétron de valência não pareado em um átomo de ponte de nitrogênio, o DPPH que possui cor púrpura é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com consequente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância. A solução com radical na presença de um doador de elétrons perde sua intensidade e se torna amarela, de acordo com o número de elétrons detidos, em que mudanças de cor acontecem quando o átomo de nitrogênio do DPPH recebe elétrons de compostos antioxidantes (VUOLO; LIMA; MARÓSTICA JR., 2018).

Em resumo, foram pipetados 20 µL de amostra previamente diluída em metanol a concentrações previamente testadas e misturados com 280 µL de DPPH diretamente em microplacas de 96 poços. Após homogenização as amostras permaneceram em repouso por 4 h, à temperatura ambiente, para processamento da reação. O resultado foi avaliado por leitura espectrofotométrica, à 525 nm, em leitor de microplacas (*SpectraMax 190 Microplate Reader, Molecular Devices*), utilizando-se metanol como branco. A atividade antioxidante foi estimada como µg de Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) por mg de fração ou extrato purificado. As amostras de atividade antioxidante foram obtidas a partir de curva padrão de DPPH ($R = 0,9882$) com diluições de Trolox em metanol variando de 0 µg mL⁻¹ a 300 µg mL⁻¹, em triplicada.

O conteúdo total de fenólicos nas frações e extrato purificado foram quantificados pelo método de Folin-Ciocalteu adaptado de Swain e Hillis (1959). Este método colorimétrico envolve a redução do reagente pelos compostos fenólicos das amostras com formação de complexo azul, cuja intensidade aumenta linearmente a 725nm. As leituras espectrofotométricas foram realizadas a 725 nm de comprimento de onda (*SpectraMax 190*

Microplate Reader, Molecular Devices). Inicialmente, com o equipamento zerado com o controle (metanol), o ácido clorogênico foi dissolvido em 95% de metanol (0 mg.mL^{-1} a 400 mg.mL^{-1}) para obter uma curva padrão ($R = 0.9993$). As amostras foram diluídas em 95 % de metanol e os resultados de fenólicos totais foram expressos como equivalentes de ácido clorogênico.

Foram pipetados, diretamente em placa de 96 poços, 15 μL da amostra diluídas em metanol, adicionados 240 μL de água ultrapura e 15 μL do reagente Folin-Ciocalteu (0,25N), os quais foram agitados e mantidos por quatro minutos para reagir. Após este tempo, adicionam-se 30 μL de carbonato de sódio (1 M), e novamente agita-se a placa deixando por 2 h para reagir.

As antocianinas totais, nas frações e no extrato, foram determinadas com um método adaptado de Lees e Francis (1972). Após a diluição da amostra em solução de etanol acidificada, foram avaliadas em pH 1.0 (95% de etanol e 1,5 N de HCl 85:15 v / v) no comprimento de onda de 535 nm no leitor de microplacas (SpectraMax 190 Microplate, Molecular Devices). Os resultados foram expressos como μg de cianidina 3-glucósido por 100 g de fração ou extrato purificado.

Atividade antioxidante, conteúdo fenólico total e antocianinas do extrato e das frações e sua respectiva estabilidade foram submetidos à análise de variância e as variáveis com efeito significativo para cada fração foram comparados pelo teste de Tukey a 5% nível de confiança no programa *Stata* 13.0.

4.2.4.2 Estabilidade do extrato e das frações de maçã cv. Gala

A avaliação da estabilidade do Extrato Purificado e das Frações foi baseada na atividade antioxidante, no teor de antocianinas e no total de compostos fenólicos. Esta etapa foi realizada no Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS. A seguintes estabilidades foram verificadas:

- Estabilidade térmica: o extrato purificado e as frações foram submetidos à variação de temperatura por tempos pré-determinados.
- Estabilidade a variação de pH: o extrato purificado e as frações foram submetidos à de pH por tempos pré-determinados.

- Estabilidade no tempo: o extrato purificado e as frações, expostos a condições controladas de temperatura e luminosidade, foram avaliados quanto à estabilidade após 0 h, 24 h e 48 h.

Para estas análises alíquotas das Frações e o Extrato Purificado foram ressuspensas em 5 mL de água OR e submetidas aos testes de estabilidade: (A) exposição à luz a 37 °C e a pH original da amostra; (B) exposição à luz a 37,0 °C e pH 4,0 (ajustado com tampão para pH da pele); (C) protegido da luz a 4,0 °C e pH original da amostra; e (D) protegido da luz a 4,0 °C e pH 4,0 (ajustado com tampão para pH da pele). As variações de luz e temperatura foram controladas dentro de uma incubadora BOD. Atividade antioxidante, conteúdo de fenóis totais e total de antocianinas foram determinados na instalação do experimento (0 h), e após 24 h e 48 h. Estes ensaios serão descritos a seguir.

4.2.4.3 Avaliação da atividade protetora da anti-genotoxicidade

Neste ensaio, o extrato e frações foram testadas na prevenção da indução de danos ao DNA em cultura de fibroblastos humanos expostos à radiação ultravioleta.

A avaliação da atividade protetora de DNA foi realizada pelo ensaio cometa (LADEIRA et al., 2004). Esse ensaio consiste basicamente na lise celular, exposição do DNA e eletroforese. Isto permite, após coloração dos fragmentos de DNA, observar se o DNA submetido à eletroforese forma uma cauda. É uma técnica rápida, simples e precisa para medir e analisar quebras no DNA das células individuais.

Inicialmente foi feita a avaliação de concentrações não citotóxicas do Extrato Purificado e das frações em fibroblastos pela técnica do MTT. Após, os fibroblastos humanos foram incubados em meios contendo as diferentes concentrações, inclusive as concentrações não citotóxicas, de Extrato purificado ou de uma das frações, por 24 h, até serem irradiados com radiação ultravioleta (UVA, UVB, e UVC). O equipamento emissor de radiação UV (SOL 500; Honle) foi estabilizado por pelo menos 15 min antes da irradiação. A irradiação emitida foi calibrada para uma intensidade de 3 J/cm² e foi aplicada por 3,0 min. Após a irradiação as células permaneceram incubadas em meio contendo o Extrato purificado ou cada uma das frações por mais 24 h.

O potencial citotóxico foi determinado através da redução de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide) para formazan (MOSMANN, 1983). Os

fibroblastos humanos com 80 % - 90 % de confluência foram tripsinados, neutralizados e centrifugados (220 g por 10 min). Na sequência foram contados fibroblastos em câmara de Neubauer e semeados (104 células por cavidade) em microplacas de 96 poços (Nunc, Roskilde, DM) para tratamento com Extrato purificado e frações nas seguintes concentrações apresentadas na Tabela 3.

Após o tratamento, as células foram incubadas por 48 h a 37,0 °C, em atmosfera úmida contendo 5,0 % de CO₂. Ao final do período de incubação por 48 h, 50 µL de MTT (5mg.mL⁻¹), dissolvido em meio Dulbecco's Eagle modificado (DMEM) com alto teor de glicose ou em DMSO 0,5 % (DMSO) e DMEM 95 % no caso da Fração III, foram adicionados a cada poço contendo as culturas celulares. Após um segundo período de incubação (4 h) as leituras espectrofotométricas foram realizadas a 570 nm (SpectraMax 190 Microplate Reader, Molecular Devices). O potencial citotóxico foi expresso em porcentagem de células mortas em comparação ao controle (DMEM) utilizando-se a equação 1 apresentada a seguir.

Eq 1:

$$morte\ celular\ (\%) = \frac{100 - (Abs_{amostra-tratada})}{Abs_{controle}} \times 100$$

As concentrações que resultaram ≤ 25 % de células mortas (baixa citotoxicidade) foram selecionados para o ensaio cometa combinado com irradiação.

Seguinda a metodologia descrita por Ladeira et al. (2004), uma alíquota (10¹² células) foi homogeneizada numa solução de agarose (0,75 %) de baixo ponto de fusão e espalhada em placas de Petri revestidas com agarose (1,00 %) de ponto de fusão normal. Após solidificação, as placas foram imersas por 24 h em solução de lise (NaCl 2,5 M, EDTA dissódico 100 mM e base Triz 10 mM, pH 10) adicionadas de Triton X-100 a 1,0 % e dimetilsulfóxido a 10,0 %. Após o período de lise, as placas foram incubadas por 5 min em PBS frio (livre de Ca²⁺ e Mg²⁺) seguido por 40 min de incubação em meio alcalino (300 mM NaOH e 1 mM EDTA, pH > 13). Todas as soluções foram preparadas no momento do uso. As células foram submetidas à eletroforese alcalina (300 mA, 25 V) por 30 min. Em seguida, as placas foram neutralizadas com três lavagens consecutivas de 5 min com tampão de neutralização (0,4 M Tris-HCl, pH 7,5) e imersas em etanol absoluto para precipitação do DNA. Controles positivos foram incubados por 2 h a 37 °C com 10 µL de

peróxido de hidrogênio, com o objetivo de avaliar as condições e eficiência da eletroforese. Cinquenta células selecionadas aleatoriamente de cada placa tiveram seu DNA corado com 50 µL de SYBR®Gold (Invitrogen-Cat. S11494) na proporção de 1:10.000, sendo analisadas em um microscópio de fluorescência (Leica DM 1000).

O comprimento da cauda do cometa foi medido usando um micrômetro ocular e o dano no DNA (cauda do cometa) foi classificado em quatro classes: A classe 1 consiste na migração menor do DNA cromossômico para o ânodo, apresentando uma pequena cauda (dano mínimo ao DNA). As classes 2, 3 e 4 apresentam aumentos progressivos no comprimento da cauda, sendo a classe 4 correspondente ao dano máximo ao DNA. O escore final atribuído a cada Extrato purificado ou frações, em suas diferentes concentrações, foi obtido através da seguinte equação 2.

Eq 2:

$$Comet\ score = \Sigma[1(n^{\circ}cél_1) + 2(n^{\circ}cél_2) + 3(n^{\circ}cél_3) + 4(n^{\circ}cél_4)]$$

Onde $n^{\circ}cél_1$ é a quantidade de células na classe 1, $n^{\circ}cél_2$ é a quantidade de células na classe 2, $n^{\circ}cél_3$ é a quantidade de células na classe 3 e $n^{\circ}cél_4$ é a quantidade de células na classe 4.

Os experimentos para avaliação da atividade anti-genotoxicidade foram conduzidos na Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Após análise de variância ($p \leq 0,05$) foi aplicado teste de Dunnet ($p \leq 0,05$) para comparação de médias de tratamentos.

4.2.4.4 Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio cristal violeta

Previamente, os fibroblastos foram incubados com extrato purificado nas seguintes concentrações: 0,049, 0,024, 0,012, 0,006, 0,0031, 0,0015, 0,0008, 0,0004 (p / v) e controle (sem extrato) durante 24 h a 37°C, em uma atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂. O sobrenadante foi cuidadosamente removido dos pratos de cultura de células e as células foram lavadas 2 vezes com 200 µl de solução tampão de lavagem e foram adicionados 100 µl de solução de reagente II (solução de cristal violeta) em cada poço incubado durante 10 minutos à temperatura ambiente. Após este tempo, a solução II foi cuidadosamente

descartada pela inversão da placa. As células serão lavadas com água destilada até o sobrenadante permanecer limpo. As placas serão naturalmente secas e as camadas celulares solubilizadas com 100 µl de solução de solubilização III (solução de ácido metanol). Os conteúdos foram homogeneizados em um agitador orbital para solubilização completa do corante e a leitura foi realizada em um leitor de microplacas com um comprimento de onda de 540 nm. A viabilidade celular foi calculada a partir da média das células viáveis em comparação com o controle (DMEN) descrita na equação 3:

Eq 3:

$$\% \text{ viabilidade celular} = \frac{100 - (Abs_{amostratratada})}{Abs_{controle}} \times 100$$

Onde $Abs_{amostratratada}$ é a absorbância das células tratadas com extrato ou fração e $Abs_{controle}$ é a absorbância das células tratadas somente com DMEN.

Todos os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP) de pelo menos três experimentos independentes e analisados por ANOVA two-way usando *Stata* (versão 13.0) com $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4.2.4.5 Avaliação do potencial antiproliferativo e anticarcinogênico

As células B16F10 de melanoma humano, SK-Mel-103 de murino e MRC5 de fibroblastos humanos (Clonetics-Cambrex-Lonza, EUA) foram incubadas em estufa a 37 °C, 95 % de umidade relativa e 5 % de CO₂, até atingirem o estágio de subconfluência (aproximadamente 80 %). Foram utilizados os seguintes meios de cultura para as células: *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), suplementado com soro fetal bovino 10 % (SBF) e solução de antibióticos 1,0 % (penicilina 10.000 ug/mL e estreptomicina 10.000 µg/mL).

O potencial antiproliferativo e anticarcinogênico do extrato purificado e das frações foram estudados da seguinte forma: culturas celulares de melanoma, mantidas em meio de cultura DMEM, suplementado com SBF 10 %, foram expostas ao extrato purificado e às suas frações, em diferentes concentrações, e por diferentes períodos de exposição.

A proliferação celular foi avaliada pela técnica de MTT (dimethyl thiazol diphenyl tetrazolium bromide) (MOSMANN, 1983). O *screening* inicial para determinar o efeito dos extratos de maçã na viabilidade celular foi realizado pelo ensaio fundamentado na redução do MTT por desidrogenases celulares em linhagens de fibroblasto, câncer de pele do tipo melanoma. Este método consiste na medida do número de células com a mitocôndria metabolicamente ativa, onde o MTT (um sal de coloração amarela e solúvel em água) reduzido no interior da mitocôndria a formazan (sal de coloração arroxeadada e insolúvel em água), acumula dentro da célula. As células classificadas como viáveis se apresentarão íntegras, incolores e redondas, enquanto as não-viáveis se mostrarão coradas de violeta (Figura 11).

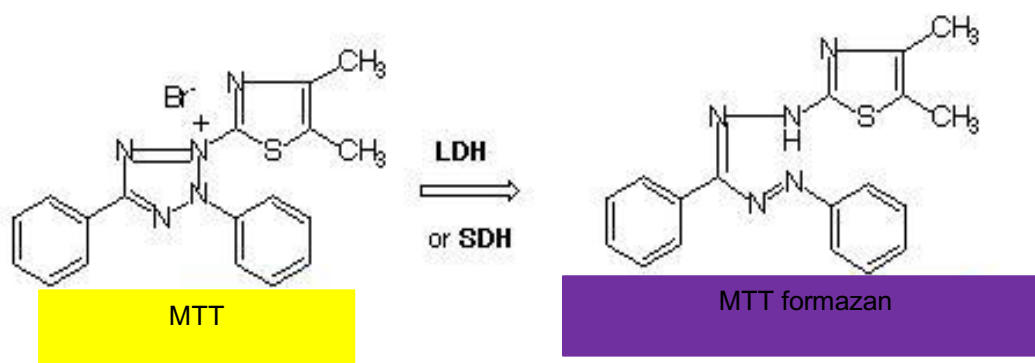


Figura 11. Redução do MTT a cristais de formazan no interior da mitocôndria celular.

As células foram tripsinizadas e contadas em câmara de Neubauer, após, as células foram cultivadas em placas de 96 poços, sendo que ao atingirem aproximadamente 80 % da confluência foram tratadas com as frações e o extrato purificado, nas diferentes concentrações. As células tratadas foram incubadas em estufa com atmosfera de CO₂ pelo período de tratamento (24 h, 48 h ou 72 h) e após isso foram adicionados ao meio de cultura 100 µL do reagente MTT (0,5 mg / mL) onde as culturas foram incubadas por mais 1 h. A absorbância foi medida em Leitor de Microplacas a 490 nm. A absorbância foi linearmente proporcional ao número de células com as mitocôndrias ativas.

Este ensaio também foi utilizado nas células de fibroblastos para verificar a viabilidade celular e em células de melanoma para verificar a morte celular. A viabilidade celular é medida pela quantidade de células viáveis comparadas ao controle (DMEM e/ou DMSO) e morte celular é medida pela quantidade de células mortas após a adição do

extrato purificado ou fração. O valor obtido pela subtração da média dos controles pela média dos brancos deve ser considerado como 100 % de células viáveis ou de células mortas. A equação 4 descrita a seguir.

Eq 4:

$$morte\ celular\ (\%) = \frac{100 - (Abs_{amostra-tratada})}{Abs_{controle}} \times 100$$

Onde $Abs_{amostratratada}$ é a absorbância das células tratadas com extrato ou fração e $Abs_{controle}$ é a absorbância das células tratadas somente com DMEN ou DMSO.

As concentrações que apresentaram ≤ 25 % de células mortas (baixa citotoxicidade) foram selecionados para o ensaio cometa combinado com irradiação.

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP), com pelo menos três repetições ($n = 3$) por tratamento. Empregou-se o aplicativo *Stata* (versão 13.0) para realizar a análise de variância ($p \leq 0,05$).

4.2.4.6 Teste de difusão em disco, concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)

A atividade antimicrobiana do extrato purificado e das frações foi avaliada pelo ensaio de difusão do disco (CLSI, 2015), com adaptações, em triplicada, no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da UFPel. As bactérias *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *S. enterica* ser. Typhimurium e *Staphylococcus aureus* foram ativadas no caldo de infusão de coração cerebral (BHI-Oxoid®) por 12 h. A água foi utilizada como controle e as análises foram realizadas em triplicata. A concentração bacteriana ajustada para $8.18 \log CFU.mL^{-1}$ (0.5 McFarland) em água de peptona (Acumedia®). O inóculo foi espalhado uniformemente com um cotonete estéril (Absorve®) na superfície das placas (Cralplast®, 90×15 mm) contendo 4 mm de Agar Mueller-Hinton (MH-Oxoid®) com pH $7 \pm 0,2$. Um disco de papel estéril (Laborclin®) de 6 mm de diâmetro adicionado ao centro de cada placa, sobre o qual foram colocados 10 μL de cada unidade experimental.

As placas foram incubadas a 37 °C e a presença de zonas de inibição ao redor do disco de papel será verificada após 24 h com um paquímetro digital (King.tools®). Utiliza-se água estéril como controle negativo e o diâmetro das zonas de inibição foi medido em milímetro (mm), assim foi definida a sensibilidade das bactérias às frações e extratos. As concentrações utilizadas nos experimentos: 500g/L e 1 g/L. Como muitas vezes é difícil comparar estudos com extratos vegetais, Alves et al. (2000) sugeriram um esquema de classificação onde os extratos com halos menores que 9 mm foram classificados como inativos, de 9 a 12 mm, parcialmente ativos, de 13 a 18 mm ativos e maiores que 18 mm muito ativos.

A concentração inibitória mínima (MIC) e a concentração bactericida mínima (CBM) foram determinadas de acordo com o método descrito por Cabral et al. (2009) com pequenas modificações. A MIC foi determinada testando a atividade das amostras (100 µl) em três concentrações diferentes: não diluída, 1: 100 (1 µL de amostra e 99 µL de DMSO) e 1: 1000 (0,1 µL de amostra e 99,9 µL de DMSO). A absorbância das soluções contendo a amostra e as bactérias foi medida a 620 nm no momento da preparação e 24h após a incubação (37°C) utilizando um espectrofotômetro (Biochrom EZ Read 400). A menor concentração de amostra na qual não houve crescimento bacteriano no meio de cultura foi considerada como a CIM. A CBM foi determinada a partir dos resultados obtidos na CIM. Aliquotas de 10 µL que não apresentaram crescimento bacteriano visível foram semeadas e incubadas por 24 horas a 37°C em ágar BHI. A menor concentração na qual não ocorreu crescimento bacteriano foi considerada como CBM.

O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial. Da combinação dos níveis de fatores experimentais resultaram 120 tratamentos (n = 3). Empregou-se o teste F ($p \leq 0,01$) na análise de variância e o teste de Tukey ($p \leq 0,01$) na comparação de médias de tratamento. O programa *Stata* 13.0 foi utilizada na análise estatística de dados.

4.2.4.7 Inibição da enzima α -glicosidase e da α -amilase

A avaliação da inibição da enzima α -glicosidase e da α -amilase em ensaios *in vitro* dos extrato e frações de maçã foi determinada por métodos espectrofotométricos em leitora de microplacas (Spectra Max 190 – Molecular Devices). O extrato purificado e frações foram ressuspendidos inicialmente em 2 mL de água e após feita a diluição seriada. Os valores de IC₅₀ foram calculados utilizando pelo menos cinco concentrações de cada extrato purificado ou fração (diluição seriada). O percentual de inibição (I %) da enzima α -glicosidase foi calculado utilizando a equação 5.

Eq 5:

$$I (\%) = \frac{(A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}})}{A_{\text{controle}}} \times 100$$

Onde A_{controle} é a absorbância da reação do controle (contendo todos os reagentes exceto o extrato purificado ou fração) e A_{amostra} é a absorbância do extrato testado na mistura de reação.

A inibição da atividade de α -glicosidase foi avaliada de acordo com Vinholes et al. (2011), utilizando o substrato nitrophenyl α -D-glucopiranosidase (3,25 mM). As frações fenólicas e extrato purificado foram diluídos em tampão fosfato a 0,1 M (pH 6,9), ficando todas na concentração de 0,95 mg / mL e após foram adicionados 10 μ L de cada fração em 50 μ L da enzima (9,375 unidades de enzima / mL). A reação foi iniciada com a adição de 50 μ L de substrato (1 mg / mL) e a mistura foi incubada a 37 °C durante 10 min. A leitura da absorbância foi realizada no comprimento de onda de 405 nm. A acarbose foi utilizada como controle positivo.

A porcentagem de inibição (I%) da enzima α -amilase foi calculada utilizando a equação 6.

Eq 6:

$$I\% = \frac{(A_{\text{controle}} - A_{\text{teste1}}) - (A_{\text{amostra}} - A_{\text{teste2}})}{(A_{\text{controle}} - A_{\text{teste1}})} \times 100$$

Onde A_{controle} é a absorbância de 100 % da atividade da enzima (+enzima - inibitor); A_{amostra} é o teste da amostra (+enzyme +inibitor); A_{teste1} é a absorção do amido devido à redução do açúcar (-enzyme -inibitor) e A_{teste2} é o inibidor + o amido (-enzima +inibitor).

Foi avaliado utilizando o procedimento descrito por Satoh et al. (2015) com algumas adaptações. A reação incluiu de 60 μL de amostra, 200 μL de tampão fosfato (pH 7,0) e 50 μL da enzima α -amilase (241,71 U mL^{-1}), sendo incubada por 5 min a 37 °C. A reação iniciou-se com a adição de 250 μL de amido solúvel como substrato, seguida de incubação por 15 min a 37 °C. Para finalizar a reação utilizou-se 50 μL de ácido clorídrico 1 M. Para a formação de cor, adicionou-se 100 μL da solução de iodo (0,005 M) + iodeto de potássio (0,005 M). A leitura de absorbância foi feita em microplacas de poliestireno contendo 96 poços (Spectra Max 190 - Molecular Devives) a um comprimento de onda de 690 nm.

A atividade (IC_{50}) do extrato e das frações de maçã foram expressos em $\mu\text{g} / \text{mL}$, e analisadas através do programa *GraphPad Prism*. As análises foram realizadas em triplicata ($n = 3$) e os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão.

5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento experimental de cada estudo está descrito em tabelas. A Tabela 2 caracteriza a composição, atividade antioxidante e a estabilidade de extratos concentrados de maçã. Além disso, será realizada a identificação de compostos fenólicos individuais das unidades experimentais. A tabela 3 ilustra o delineamento experimental da capacidade antienvhecimento de extratos de maçã. A tabela 4 apresenta o delineamento experimental da capacidade anticarcinogênica de extratos de maçã frente a células de melanoma, a tabela 5, o delineamento experimental da atividade antibacteriana dos extratos de maçã e a tabela 6, por fim, apresenta o delineamento experimental para a variável inibição enzimática.

Tabela 2. Delineamento experimental para caracterizar composição, atividade antioxidante e estabilidade de extratos de maçã cv. *Gala*.

VARIÁVEIS INDEPENDENTES					VARIÁVEIS DEPENDENTES
Unidade experimental	Tempo de exposição	Luz	pH	Temperatura	
Extrato Purificado	0h	Com	4.0	4°C	Estabilidade:
Fração I					Atividade antioxidante (µg trolox equivalent/mg)
Fração II	24 h	Sem	7.0	37°C	Compostos fenólicos totais (µg ac clorogenic/mg)
Fração III					Antocianinas totais (µg cyanidin 3-glucoside por 100g)
Fração IV	48h				

O experimento será conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial. Da combinação dos níveis de fatores experimentais resultaram 120 tratamentos (n = 4). Empregou-se o teste F ($p \leq 0,01$) na análise de variância e o teste de Tukey ($p \leq 0,01$) na comparação de médias de tratamento. O programa Stata 13.0 foi utilizada na análise estatística de dados.

Tabela 3. Delineamento experimental da capacidade antienvhecimento de extratos de maçã cv. *Gala*.

VARIÁVEIS INDEPENDENTES			VARIÁVEIS DEPENDENTES	
Unidade experimental	Concentrações (mg / mL)	radiação UV	célula	
Extrato Purificado	5; 2;5; 1,25; 0,625; 0,313; 0,156; 0,078; 0,039; 0,02; 0,0098; 0,0049; 0,0024; 0,00122; 0,00061; 0,00031; 0,000153; 0,000076 e 0,000038	3 J / cm ² / 24 h	Fibroblasto MRC5	(1) viabilidade celular por MTT, (2) capacidade antiproliferativa pelo Ensaio Cometa, (3) viabilidade celular pelo ensaio cristal violeta
Fração I	3,289; 1,645; 0,822; 0,411; 0,206;			
Fração II	0,103; 0,051; 0,026; 0,013; 0,0064; 0,0032; 0,0016; 0,0008; 0,0004; 0,0002; 0,0001; 0,00005 e 0,000025			
Fração III	3,289; 1,645; 0,822; 0,411; 0,206;			
Fração IV	0,103; 0,051; 0,026; 0,013; 0,0064; 0,0032; 0,0016; 0,0008; 0,0004; 0,0002; 0,0001; 0,00005 e 0,000025			

O experimento será conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial. Da combinação dos níveis de fatores experimentais resultaram 90 tratamentos (n = 3). Empregou-se o teste F ($p \leq 0,01$) na análise de variância e o teste de Dunnet ($p \leq 0,01$) na comparação de médias de tratamento. O programa Stata 13.0 foi utilizada na análise estatística de dados. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Tabela 4. Delineamento experimental da capacidade anticarcinogênica de extratos de maçã cv. *Gala* frente a células de melanoma.

VARIÁVEIS INDEPENDENTES				VARIÁVEIS DEPENDENTES
Unidade experimental	Concentração	Tipo de célula	Tempo	
Extrato Purificado				Citotoxicidade celular por MTT: % de citotoxicidade celular
Fração I	31,25 µg/mL	SK-mel 108 (humano)	24h	
	62,5 µg/mL	Melanoma		
Fração II	125 µg/mL	B16F10 (rato)	48h	
	250 µg/mL	MRC5		
Fração III	500 µg/mL	(fibroblastos)		
Fração IV			72h	

O experimento será conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial. Da combinação dos níveis de fatores experimentais resultaram 225 tratamentos (n = 3). Empregou-se o teste F ($p \leq 0,01$) na análise de variância e o teste de Tukey ($p \leq 0,01$) na comparação de médias de tratamento. O programa Stata 13.0 foi utilizada na análise estatística de dados.

Tabela 5. Delineamento experimental da atividade antibacteriana dos extratos de maçã cv. *Gala*.

UNIDADE EXPERIMENTAL	VARIÁVEIS INDEPENDENTES			VARIÁVEIS DEPENDENTES
	Tempo de exposição	Concentração	Bactérias	
Extrato Purificado				
Fração I	24 h	500g/L	<i>Escherichia coli</i> <i>Listeria monocytogenes</i>	Capacidade anti- bacteriológica:* Difusão em disco
Fração II	48 h		<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	
Fração III		1 g/L	<i>Staphylococcus aureus</i>	
Fração IV	72 h			

O experimento será conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial. Da combinação dos níveis de fatores experimentais resultaram 120 tratamentos (n = 3). Empregou-se o teste F ($p \leq 0,01$) na análise de variância e o teste de Tukey ($p \leq 0,01$) na comparação de médias de tratamento. O programa Stata 13.0 foi utilizada na análise estatística de dados.

Tabela 6. Delineamento experimental da atividade inibitória de enzimas digestivas de extratos de maçã cv. *Gala*.

UNIDADE	VARIÁVEIS INDEPENDENTES			VARIÁVEIS DEPENDENTES
EXPERIMENTAL	Controle	Concentração	Enzimas	
Extrato Purificado				
Fração I				
Fração II	Acarbose	Diluição seriada	α -amilase α -glicosidase	Percentual de inibição IC_{50} em $\mu g / mL^{-1}$
Fração III				
Fração IV				

O experimento será conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial. analisados através do programa *GraphPad Prism*. As análises foram realizadas em triplicata ($n = 3$) e expressas como $\pm$ média do erro padrão utilizando o programa Microsoft Excel.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Compostos bioativos da maçã cv. Gala

Existem evidências crescentes de que o consumo de fitoquímicos auxiliam na prevenção de doenças crônicas não transmissíveis especialmente com efeitos protetores contra doenças cardiovasculares, cânceres e doenças neurodegenerativas (GONZÁLEZ-SARRÍAS et al., 2017; RICCIO et al., 2017; GROSSO, 2018), provavelmente, devido ao conteúdo de substâncias bioativas, como os compostos fenólicos, que estão relacionados, diretamente, com ações como atividade antioxidante e anti-inflamatória em alimentos (GROSSO, 2018).

A concentração fenólica total dos extratos de maçã cv. Gala variaram consideravelmente ($47,4 \pm 16,1$ a $620,6 \pm 39,8$ $\mu\text{g} / \text{mg}$ de fração ou extrato liofilizados) (Figura 12). A maior concentração fenólica foi observada na fração IV ($620,6 \pm 39,8$ $\mu\text{g} / \text{mg}$), seguida da fração III ($459,3 \pm 19,8$ $\mu\text{g} / \text{mg}$) e do extrato purificado ($390,8 \pm 12,2$ $\mu\text{g} / \text{mg}$). Maçãs da cv. fuji apresentaram $4,1$ μg de equivalentes de ácido clorogênico por mg de fruta fresca (YURI et al., 2014). Em extratos hidrometanólicos de maçãs cv. Bravo de esmolfe também foi menor o conteúdo de fenólicos ($43,03 \pm 1,71$ $\mu\text{g} / \text{mL}$ de extrato) mas deve-se levar em conta que este extrato não foi liofilizado e nem fracionado ou purificado (PIRES et al., 2018). A título de curiosidade, maçãs cv. gala cultivadas no Brasil apresentam uma média de 520 mg ácido clorogênico/100 g de frutas frescas (ALBERTI et al., 2014), demonstrando a capacidade de concentração de compostos fenólicos com a técnica utilizada. Os menores conteúdos de compostos fenólicos foram encontrados na fração I e II.

Os resultados de antocianinas nas frações e extratos estão descritos na figura 12. A fração III apresentou $0,271$ μg cianidina 3-glicosídeo por 100g de fração, seguida pelo extrato purificado que tinha $0,186$ 3-glucosídeo por 100g de extrato e após, fração IV com $0,153$ μg cianidina 3-glicosídeo por 100g de fração e por fim as frações I e II, ambas com $0,145$ 3- μg cianidina 3-glicosídeo por 100g de frações. Em princípio, de acordo com a técnica de fracionamento utilizada, a fração II deveria concentrar antocianinas monoméricas, no entanto, este comportamento não foi observado na matéria-prima utilizada. Provavelmente, antocianinas monoméricas estariam na casca das maçãs, e isso, talvez aconteceu em virtude da técnica de extração não ter conseguido obtê-las em modo negativo e obtendo somente a cianidina3-glucosídeo, na ionização positiva. Portanto, o total

de antocianinas também foi bem baixo nas análises, mesmo comparando com outros extratos e frutas frescas. Isso talvez seja explicado pois sabe-se que estes compostos estão presentes na casca da fruta e ao utilizar a fruta inteira, a quantidade tenha sido diluída.

A concentração de antocianinas em maçã pode ser atribuída a cultivar, a variação de temperaturas diurna e noturna, e ao número de horas de luz solar durante o amadurecimento (DROGOUDI; MICHAILIDIS; PANTELIDIS, 2008; WOJDYLO et al., 2008; MARINHO et al., 2009; VIEIRA et al., 2009). Ainda, nas frutas frescas da maçã cv. Gala, assim como em várias outras frutas, há grande variação na concentração de antocianinas quando comparado casca, polpa e fruta inteira (WOLFE; LIU, 2003; ŁATA, 2007), o que também foi observado utilizando difentes cultivares produzidas no Brasil (VIEIRA et al.; 2011) ou exterior (WOLFE; LIU, 2003). Assim, a concentração pouco expressiva de antocianinas pode ser facilmente explicada pelo fato da extração inicial da matéria-prima ter sido realizada com a fruta inteira (casca, polpa e sementes), simulando um processo industrial de produção de extratos naturais.

Quanto a atividade antioxidante total foi observada que esta foi maior na fração IV, seguida pelo extrato purificado e pela fração III, sendo de 1226,8 µg, 814,2 µg, 763,3 µg do equivalente trolox por mg de fração ou extrato liofilizado, respectivamente (Figura 12). Os compostos fenólicos possuem a característica de conter pelo menos um anel aromático com um grupo hidroxila em sua estrutura, sendo este um dos fatores que confere a eles propriedades antioxidantes (LA ROSA et al., 2018). Estudos com frutas exóticas brasileiras atribuíram a atividade antioxidante à presença de ácidos fenólicos, ácido tânico e a proantocianidina (ALMEIDA et al., 2011), compostos estes também encontrados nas três frações citadas com atividade antioxidante mais elevada no presente trabalho. A atribuição de elevada atividade antioxidante à presença de ácidos fenólicos pode estar relacionada a sua dependência dos números e posições dos grupos hidroxila em relação ao grupo funcional carboxila, sendo que a atividade aumenta quanto maior o grau de hidroxilação do ácido (GARCIA-SALAS et al., 2010). Em outras espécies, como a batata-doce roxa, o ácido clorogênico foi o composto fenólico que atuou como o principal sequestrador de radicais DPPH (OKI et al., 2002). Já o flavonoide florentina, é um derivado da chalcona, também tem sido reportada com alta atividade antioxidante e parece que atua como filtro do UV nas folhas das plantas (RUPASINGHE; YASMIN, 2010; MANZANO; WILLIAMSON, 2010; NINOMIYA, M.; KOKETSU, 2013) podendo variar muito seu teor conforme cultivar de maçã

(MARCHEV et al., 2013), por exemplo, a Golden Delicious é 2,5 e 3,6 vezes maior do que a capacidade da Fuji e da Gala, respectivamente (ZARDO et al., 2013).

Houve correlação entre o conteúdo total de compostos fenólicos e a atividade antioxidante total, conforme demonstrado na figura 12 ($p < 0,05$). Vários estudos, para diferentes espécies, relatam correlação positiva entre estes dois fatores (OKI et al., 2002; KUSKOSKI et al., 2005; MAHATTANATAWEE et al., 2006; BAGETTI, et al., 2009; REDDY; SREERAMULU; RAGHUNATH, 2010; ALMEIDA et al., 2011; HIRSCH et al., 2013).

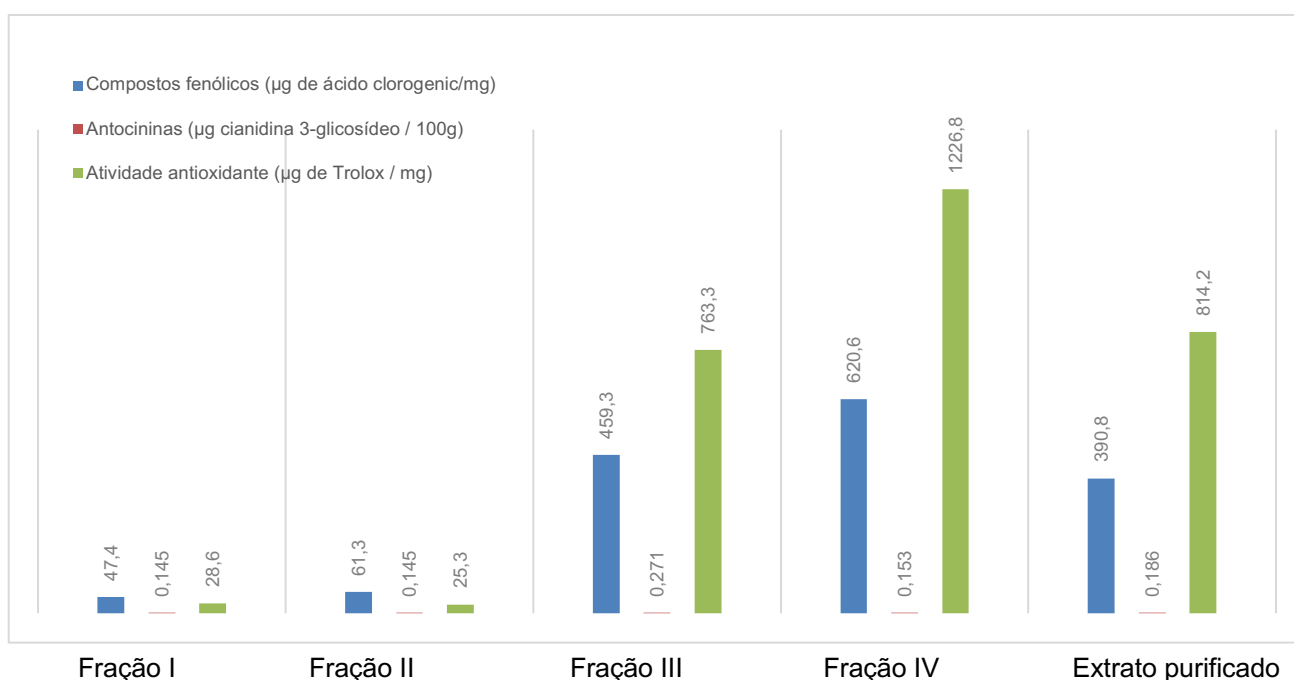


Figura 12. Compostos fenólicos totais, antocianinas totais e atividade antioxidante do extrato purificado e das frações de maçã cv. gala. Os valores correspondem às médias ($n = 3$) $\pm$ desvios-padrão; * µg de trolox equivalente por mg de amostra liofilizada; ** µg de equivalente de ácido clorogênico por mg de amostra liofilizada. Anova $p < 0,05$.

O perfil fenólico do extrato e frações da maçã cv. Gala revelou a presença de 31 compostos fenólicos e quatro não fenólicos (Tabela 7). Dentre os compostos identificados, em modo negativo, estão flavonóis (quercetina, kaempferol e rutina), dihidrochalconas (florentina e floridizina), flavanol (epicatequina e procianidinas) e ácidos fenólicos (ácido cafeico e ácido cumárico), alguns na sua forma conjugada, co-valentemente ligados a açúcares, por O-glicosídico ou menos comumente por ligações C-glicosídicas, e ainda ligados a ácidos orgânicos, especialmente nas frações III e IV e purificado. Em modo

positivo de ionização, a fração IV e o extrato purificado apresentaram cianidina-3-galactosídeo. Diferentes técnicas têm sido utilizadas para extração de compostos fenólicos em maçãs e outras frutas (OSZMIAŃSKI et al., 2015; ALBERTI et al., 2017).

Estes compostos, em sua maioria, já foram reportados na literatura para maçãs (TSAO et al., 2003; LIAUDANSKAS et al., 2014a; LIAUDANSKAS et al., 2014b; RANA; BHUSHAN, 2016; KSCHONSEK et al., 2018), com concentrações diferentes conforme cada cultivar e fatores externos (MANACH et al., 2005), sendo que, no caso das antocianinas, a cianidina-3-galactosídeo é a principal responsável pela cor da casca desta fruta localizados principalmente nos vacúolos das células vegetais (IGLESIAS; ECHEVERRÉ; SORIA, 2008).

No extrato purificado (tecnicamente livre de açúcares e ácidos orgânicos), foi possível a identificação de quatro flavonóis, quatro flavanóis, dois ácidos hidroxinâmicos e três dihidrochalconas, sendo eles procianidinas, epicatequinas, quercetinas, florentina e ácidos 4 p-coumaroilquínico e clorogênico (Tabela 7). Para as três cultivares mais produzidas no Brasil (Golden Delicious, Fuji e Gala) os compostos catequina, epicatequina, ácido clorogênico, procianidina B1, procianidina B2, florentina, juntamente com Kaempferol-3-glucosídeo e quercetinas, estão entre os principais compostos encontrados (FELICIANO et al. 2010; ZARDO et al., 2013), sendo que os glicosídeos de quercetina são, frequentemente, difíceis de separar (KSCHONSEK et al., 2018). Um perfil parecido foi observado para maçãs da cv. Royal Gala (HENRY-KIRK et al., 2012) e com outros compostos em como rutina, avicularina e cianidina 3-O-galactosídeo (SIMMONDS; HOWES, 2018).

Também em extratos de bagaço de maçã industrial foi encontrado perfil semelhante como procianidinas, ácido clorogênico, catequinas, epicatequina, quercetinas, além da florentina (LU; FOO, 2000; BAI; ZHANG; REN, 2013), e mesmo utilizando diferentes cultivares e formas de extração o perfil fenólico não apresenta grande variação (identificaram também ácido gálico, rutina e florentina) (GRIGORAS et al. 2013). A presença da florentina se deve ao fato da extração ter sido realizada com a fruta inteira e este composto fenólico foi identificado como o dominante nas sementes (XU et al., 2016) e em extratos com condições acidificadas (MARCHEV et al., 2013). No presente estudo, a florentina foi identificada no extrato purificado e nas frações III e IV.

Alguns estudos já elencam maçãs como fonte de catequinas, quercetinas, ácido clorogênico e cafeico (ESCARPA; GONZÁLEZ, 1998; LU; FOO, 2000; HE; LIU, 2008; FRANCINI; SEBASTIANI, 2013; KSCHONSEK et al., 2018). O ácido clorogênico apareceu no extrato purificado e nas frações III e IV, também. Este foi o único ácido hidrocínâmico reportado em polpas de maçãs vermelhas e brancas (WANG et al., 2015). Nas três cultivares mais produzidas no Brasil, Golden Delicious, Fuji e Gala, o perfil fenólico mostrou ácido 5-cafeoilquínico, (2) -epicatequina, procianidina B2 e florentina, sendo as procianidinas predominantes e quercetinas, a minoria (ZARDO et al., 2013).

Na fração I foi identificado um ácido carboxílico, o ácido málico, talvez em pequenas concentrações. Este composto deveria ter sido eliminado junto com os outros ácidos orgânicos. Os ácidos fenólicos, derivados benzóico e/ou hidroxicinâmico, deveriam ser encontrados no extrato purificado e, principalmente, na fração I mas isso não aconteceu. Estes ácidos fenólicos ocorrem na natureza na forma de éster associada com ácidos carboxílicos ou glicose. Cabe destacar que os ácidos fenólicos são, na maioria das vezes, de média polaridade, muito reativos, e suscetíveis à ação de enzimas (SUSREZ; PICINELLI; MANGAS, 1996). Desaminação, hidroxilação e metilação são as três principais reações envolvidas na formação de ácidos fenólicos. Alguns compostos fenólicos, como ácido cafeico, pode ser degradado durante o aquecimento (LOU et al., 2014). Nesta fração, os picos 5, 6 e 7 do cromatograma não foram identificados com base na literatura ou padrões, de acordo com a figura 13A.

Compostos fenólicos foram fracionados de sucos de maçãs em grupos neutros e ácidos, também por extração em fase sólida, possibilitando a identificação de ácido clorogênico, epicatequina, florentina e quercetina em diferentes frações (ZESSNER et al., 2008). Diferentes acidificações do solvente são comumente realizadas quando todas as subclasses de fenólicos são co-extraídas. Outro estudo que extraiu flavonóis de casca de maçã 'Idared' descreveu que a concentração crescente de HCl adicionada ao metanol é diretamente proporcional à recuperação da quercetina, mas inversamente proporcional à recuperação de seus glicosídeos pois promove uma hidrólise quebrando os açúcares pela alta acidez (RUPASINGHE; KATHIRVEL; HUBER, 2011).

Na fração II foi possível identificar três flavanols, três ácidos hidroxinâmicos e uma flavanona, dentre eles procianidinas, catequinas, ácido caféico, ácido p-coumaroilquínico e eriodictol hexosídeo. Nesta fração, pela técnica aplicada, era esperado encontrar

antocianinas monoméricas como a cianidina-3-galactosídeo. Pelo perfil apresentado se observa que a técnica não foi eficiente na separação de compostos fenólicos desta matéria-prima ou o equipamento não foi eficiente na detecção deste composto. Ainda, como estes compostos não estão quantificados, pode ser que as concentrações dos compostos indesejados nesta fração seja pequena.

Já na fração III, foi possível identificar três flavonols, três dihidrochalconas três flavanols e três ácidos hidroxinâmicos, sendo eles procianidinas, epicatequinas, quercetinas, florentinas, ácido clorogênico e ácido 4 p-coumaroilquínico. O flavonoide florentina, é característico de maçã e seus derivados e foi encontrado na fração III, na IV e no extrato purificado. Este composto tem fraca solubilidade em água, assim como outros fenólicos naturalmente existente em frutas e vegetais, pois são, geralmente, covalentemente ligados a polímeros insolúveis e muitas vezes o tratamento térmico pode ser usado para liberar seus compostos ligantes (LOU et al., 2014).

Por fim, na fração IV foram identificadas quatro flavonols, quatro flavanols, três dihidrochalconas e dois ácidos hidroxinâmicos. Nesta fração, pela técnica utilizada, se concentram os compostos polimerizados. No entanto, foram encontradas, assim como na fração III, epicatequina e procianidinas, quercetinas, ácidos fenólicos (clorogênico e p-cumárico), e florentinas. O metanol, foi o solvente utilizado para extração de compostos desta fração, e possibilitou a extração de moléculas grandes e polimerizadas.

Especialmente, as catequinas e epicatequinas, identificadas nesta fração, por ter alto peso molecular devido as suas várias unidades de flavanol na estrutura (polimerizadas), foram eluídas nesta fração. A heterogeneidade estrutural dos flavonóides, possibilita diferentes reações de hidroxilação, O-metilação, clivagem do heterociclo, desglicosilação e cisão de espécies poliméricas em unidades para que tenha alguma atividade específica (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002).

As procianidinas devem estar em maior quantidade nesta fração. Elas, estão presentes em maior quantidade, especialmente em maçãs não amadurecidas, e são compostas de formas polimerizadas de (-) - epicatequinas e (+) – catequinas formando polímeros com alta diversidade estrutural (MASUDA et al., 2018).

O composto florentina, extraído na fração III e IV, foi assim obtido com metanol e acetato de metila, pois a polaridade dele é dificilmente afetada por um desvio de pH devido seu valor de pKa e da sua dificuldade de dissociação em meio ácido, portanto, a

recuperação pela sílica adsorvente é menos afetada após a alteração do acidez das soluções (KAMMERER et al., 2011). Os níveis de compostos fenólicos, como a florentina, diminuem significativamente durante o processamento, portanto, mais pesquisas são necessárias para procurar maneiras de otimizar os níveis desses compostos em produtos derivados da maçã.

A literatura aponta perfil fenólico semelhante ao encontrado neste trabalho, no entanto, se evitou comparações relacionadas a concentrações em virtude dos compostos não terem sido quantificados nas unidades experimentais, sendo esta uma limitação do estudo.

Tabela 7. Perfil fenólico de extrato purificado e de frações liofilizadas de maçã cv. Gala.

Extrato ou frações	Pico nº.	Tempo de retenção ^a	Classe: subclasse ^b	Grupo químico ^c
Extrato purificado ^d	1	2,76	Flavonóide: Flavanol	Procianidina B (dímero)
	2	3,05	Ácido Fenólico: ácidos hidrocinânicos	Ácido clorogênico
	3	3,25	Flavonóide: Flavanol	Procianidina B (isômero)
	4	3,35	Outros	Amigdalina
	5	3,51	Flavonóide: Flavanol	Epicatequina
	6	3,59	Ácido Fenólico: ácidos hidrocinânicos	4 p-coumaroilquínico
	7	3,74	Flavonóide: Flavanol	Procianidina B (trímero)
	8	4,12	Flavonóide: Flavanol	Quercetina-3-O-rutinosídeo
	9	4,24	Flavonóide: Flavanol	Quercetina-O-hexosídeo
	10	4,46	Flavonóide: Flavanol	Quercetina (derivado)
	11	4,62	Flavonóide: Flavanol	Quercetina-O-pentosídeo
	12	4,76	Flavonóide (Dihidrochalconas)	Florentina -2'-O-(2"-O-xylosil)- glucosídeo
	13	4,82	Flavonóide (Dihidrochalconas)	Florentina -2'-O-(2"-O-xylosil) glucosídeo (isômero)
	14	5,19	Flavonóide (Dihidrochalconas)	Florentina-2'-O-glucosídeo
Extrato purificado ^e	1	2,79	Flavonóide: Antocianina	Cianidina 3-galactosídeo
Fração I	1	0,99	Ácido carboxílico	Ácido Málico
	2	1,44	Outro	Glucosil-O-pentosil-O-glucosídeo
	3	1,67	Outro	Oligômeros de hexoses
	4	3,46	Outro	Carboxibenzoato
Fração II	1	2,76	Flavonóide: Flavanol	Procianidina B (dímero)
	2	3,05	Ácido Fenólico: ácidos hidrocinânicos	Ácido cafeico (Ácido 5-O-cafeoilquínico)
	3	3,25	Flavonóide: Flavanol	Procianidina B (trímero)
	5	3,48	Ácido Fenólico: ácidos hidrocinânicos	Ácido cafêico (isômero)
	6	3,60	Ácido Fenólico: ácidos hidrocinânicos	4 p-coumaroilquínico (derivado)
	9	4,35	Flavonóide: Flavanona	Eriodictol hexosídeo
	10	4,53	Flavonóide: Flavanol	Isômeros de catequina

Continua tabela 1

Extrato ou frações	Pico nº.	Tempo de retenção ^a	Classe: subclasse ^b	Grupo químico ^c
Fração III	1	2,76	Flavonóide: Flavanol	Procianidina B (dímero)
	2	3,05	Ácido Fenólico: ácidos hidrocínânicos	Ácido clorogênico
	3	3,25	Flavonóide: Flavanol	Procianidina B (trímero)
	4	3,51	Flavonóide: Flavanol	(-) Epicatequina
	5	3,59	Ácido Fenólico: ácidos hidrocínânicos	4 p-coumaroilquínico
	6	3,74	Flavonóide: Flavanol	Procianidina B (trímero) (contaminante em <i>m/z</i> 351)
	7	4,12	Flavonóide: Flavanol	Quercetina-3-O-glucosídeo ou Quercetina galactosídeo ou isoquercetrina
	8	4,30	Flavonóide: Flavanol	Quercetina-3-O-galactosídeo
	9	4,76	Flavonóide (dehidrochacona)	Florentina-2'-O-xiloyl-glucosídeo
	10	5,19	Flavonóide (dehidrochacona)	Florentina -2'-O-glucosídeo
	11	5,92	Flavonóide: Flavanol	Quercetina
	12	6,65	Flavonóide (dehidrochacona)	Florentina
Fração IV ^d	1	2,76	Flavonóide: Flavanol	Procianidina B (dímero)
	2	3,05	Ácido Fenólico: ácidos hidrocínânicos	Ácido clorogênico
	3	3,25	Flavonóide: Flavanol	Procianidina B (isômero)
	4	3,35	Outros	Amigdalina
	5	3,51	Flavonóide: Flavanol	(-) Epicatequina
	6	3,59	Ácido Fenólico: ácidos hidrocínânicos	Ácido p-cumárico
	7	3,74	Flavonóide: Flavanol	Procianidina B (trímero)
	8	4,12	Flavonóide: Flavanol	Quercetina-3-O-rutinosídeo
	9	4,24	Flavonóide: Flavanol	Quercetina hexosídeo
	10	4,46	Flavonóide: Flavanol	Quercetina derivado
	11	4,62	Flavonóide: Flavanol	Quercetina-O- α -L-arabinofuranosídeo
	12	4,76	Flavonóide (Dihidrochalconas)	Florentina -2ofuranosídeoomer glucosídeo
	13	4,82	Flavonóide (Dihidrochalconas)	Florentina -2ofuranosídeoomer pad glucosídeo (isômero)
	14	5,19	Flavonóide (Dihidrochalconas)	Florentina -2'-O-glucosídeo
Fração IV ^e	1	2,76	Flavonóide: Antocianina	Cianidina 3-glucosídeo

^aTempo em minutos ^bClassificados com base: <http://phenol-explorer.eu/compounds> ^cIdentificados usando um padrão ^dModo negativo

^eModo positivo

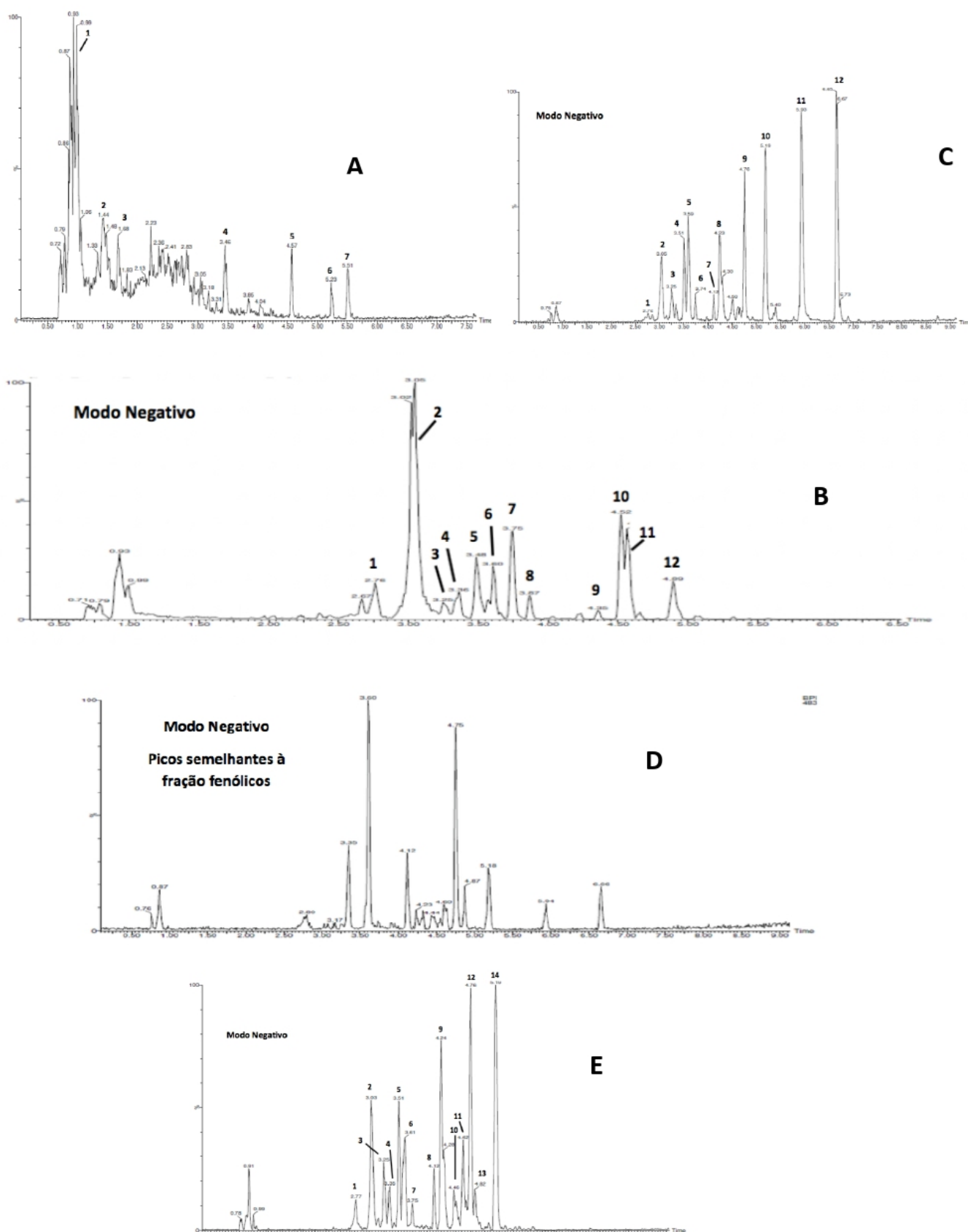


Figura 13- Cromatogramas UPLC-Qtof-MS em modo negativo para frações e extrato de maçã cv. gala. A: Fração I - Ácidos fenólicos com pico 5, 6 e 7 não identificados; B: Fração 2 - Antocianinas monoméricas com pico 4, 7, 8, 11 e 12 não identificados; C: Fração 3 - Flavonóides; D: Antocianinas poliméricas e E: extrato purificado. Fases móveis com 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (B), gradiente variando de 0-15 min (2-95%) B; (15,1-17 min (100%) de B; (17.1-19.1 min (2%) de B, fluxo de 0,4 ml/min e volume de injeção de 5 ul.

6.2 Estabilidade do extrato purificado e das frações fenólicas de maçã cv. gala

O estudo preliminar de estabilidade de compostos é fundamental para o desenvolvimento de novas formulações, ele ajuda a monitorar e verificar com antecedência o desempenho do produto contra várias condições de validade, intervalo de tempo, fornecendo dados sobre a manutenção das características de ação biológica desde a produção até a data de vencimento (CARDOSO et al., 2011).

A estabilidade de tempo, temperatura, luz e de pH da unidade experimental foi verificada nas tabelas 8, 9 e 10. A estabilidade destes compostos é fundamentalmente importante para que seu uso seja efetivo na aplicação em produtos farmacêuticos, cosméticos ou alimentícios. E, sabe-se que os compostos fenólicos se degradam com exposição à luz, à temperatura, alteração de pH, adição de UV.

Em relação aos resultados, na condição de armazenamento ótima, protegido da luz e temperatura de 4°C, os compostos fenólicos do extrato purificado e das frações se mantiveram até 48h sem degradação, com exceção da fração II, III e IV sem alteração de pH. Já para as condições de armazenamento normal, exposto à luz e temperatura de 37°C, degradou os compostos em todas as amostras, independente de pH, com exceção da fração IV que se manteve sem alteração no pH 4,0 (Tabela 8). A diferença entre armazenamento normal e ótimo está na temperatura (4 °C ou 37 °C) e na exposição ou não à luz. De forma geral, é possível observar uma manutenção dos compostos fenólicos quando seu armazenamento está sob condições de proteção da luminosidade e em baixa temperatura e em algumas situações com alteração de pH.

Tabela 8. Concentração total de compostos fenólicos (µg) do extrato purificado e das frações de maçã cv. *Gala* de acordo com alteração de pH, de luz e tempo de armazenamento.

Fração ou extrato	Tratamento ^b	Conteúdo total de fenólicos durante o armazenamento ^a					
		Normal ^c			Ótimo ^d		
		0h	24h	48h	0h	24h	48h
Extrato purificado	pH amostra	528,6±27,2bA	492,3±38,7aA	365,0±28,5aB	386,2±3,4aA	406,0±3,3aA	402,1±5,6a A
	pH pele	661,8±33,0aA	471,4±56,9aB	355,2±2,6aC	349,4±40,2bA	347,5±25,2bA	358,7±3,8b A
Fração I	pH amostra	55,2±8,8aA	36,7±3,1aB	7,9±5,2aC	15,7±3,1aA	12,3±0,5aA	6,6±2,4bA
	pH pele	27,3±3,6bA	26,4±2,0aA	6,4±4,5aB	13,0±1,4aA	19,7±1,1aA	19,4±0,9aA
Fração II	pH amostra	30,7±1,3aA	28,6±3,6aA	10,9±1,8aB	62,7±1,3aA	31,9±1,7aB	29,3±1,5aB
	pH pele	32,4±6,1aA	29,0±1,8aA	9,9±2,8aA	17,6±1,1bA	27,9±3,2aA	19,2±1,7aA
Fração III	pH amostra	499,5±20,4aA	541,6±31,7aA	409,2±24,8aB	450,0±12,0aA	407,6±7,8aB	398,0±7,9bB
	pH pele	475,5±30,9aA	385,9±6,4bB	375,8±27,1aB	430,6±14,7aA	422,4±26,3aA	441,2±2,1aA
Fração IV	pH amostra	774,2±25,4aA	650,6±3,5aB	585,1±18,4aB	522,6±8,8aB	571,3±56,7aA	508,3±16,1aB
	pH pele	504,0±29,1bA	501,0±33,4bA	417,7±55,2bA	429,6±14,2bA	437,0±3,0bA	433,5±3,2bA

^aDados indicam média (± DP) para 4 repetições onde letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey, Fenólicos foram expressos em µg equivalentes do ácido clorogênico/mg fração ou extratos, ^b pH 4,0 da pele alterado com tampão, ^c Exposto à luz combinado com temperatura de 37 ° C; ^d Protegido da luz combinado com a temperatura de 4 ° C.

Em relação às antocianinas, o extrato purificado e frações apresentaram pequenas concentrações deste fitoquímico. O armazenamento em condições normais foi eficaz em manter a concentração de antocianinas no decorrer do tempo, e o armazenamento em condições ótimas aumentaram seus valores (Tabela 9).

Dentre as frações e extratos, a fração III se destacou no total de antocianinas no pH original da fração, sem alteração. Já no armazenamento sob condições ótimas o total de antocianinas aumentou no decorrer do armazenamento. Este fato se repetiu mesmo repetindo várias vezes o mesmo experimento e este aumento foi de 2 a 3 x o valor inicial, especialmente no extrato purificado. A hipótese é de que este resultado pode indicar uma concentração de antocianinas ao longo do tempo pela redução de umidade. Uma segunda hipótese é que tenha tido algum tipo de degradação durante o armazenamento e que ao longo dos experimentos foi conseguido uma melhor identificação dos compostos a partir da sua polimerização ou separação de grupamentos das antocianinas. Em uma matriz diferente (sucos de açaí) as altas taxas de polimerização de antocianinas durante o armazenamento, aumenta o total de antocianinas poliméricas de 70-80% em 8 dias a 35°C (PACHECO-PALENCIA; HAWKEN; TALCOTT, 2007).

O armazenamento de extratos de diversas frutas tem uma tendência em reduzir a estabilidade das antocianinas ao longo do armazenamento, seja ele refrigerado ou congelado e também a estabilidade se mostrou dependente do pH utilizado (HURTADO et al., 2009; PLISZKA et al., 2013). Talvez o meio acidificado do método facilitou a alteração nas estruturas das antocianinas durante o armazenamento aumentando o grau de extração.

A. I

A estrutura molecular das antocianinas tem sua natureza iônica, por isso sua coloração depende do pH solução (vermelhas em meio ácido, púrpura em pH neutro e azul em pH crescente. Dependendo do pH e da estabilidade da antocianina, pode ocorrer a sua polimerização. Pesquisas atuais em vinho revelaram que reações de taninos produzem tanto polímeros maiores quanto espécies menores, reações de antocianinas podem gerar espécies incolores e também pequenos pigmentos poliméricos (FRANCIA-ARICHA et al., 1997).

Tabela 9. Concentração total de antocianinas (μg) do extrato purificado e das frações liofilizadas de maçã cv. *Gala* de acordo com alteração de pH, de luz e tempo de armazenamento.

Fração ou extrato	Tratamento ^b	Total de antocianinas durante o armazenamento ^a					
		Normal ^c			Ótimo ^d		
		0h	24h	48h	0h	24h	48h
Extrato purificado	pH amostra	0,186 $\pm$ 0,002 aA	0,204 $\pm$ 0,004aB	0,193 $\pm$ 0,015aB	0,736 $\pm$ 0,004aA	1,140 $\pm$ 0,097aB	1,205 $\pm$ 0,153aB
	pH pele	0,175 $\pm$ 0,002aA	0,160 $\pm$ 0,003bB	0,159 $\pm$ 0,009bB	0,286 $\pm$ 0,007bA	0,609 $\pm$ 0,027bB	0,666 $\pm$ 0,025aB
Fração I	pH amostra	0,145 $\pm$ 0,006aA	0,155 $\pm$ 0,007aA	0,151 $\pm$ 0,007aA	0,160 $\pm$ 0,010aA	0,380 $\pm$ 0,033bB	0,474 $\pm$ 0,016aB
	pH pele	0,141 $\pm$ 0,010aA	0,149 $\pm$ 0,010aA	0,145 $\pm$ 0,016aA	0,155 $\pm$ 0,007aA	0,461 $\pm$ 0,018aB	0,499 $\pm$ 0,031aB
Fração II	pH amostra	0,145 $\pm$ 0,013aA	0,158 $\pm$ 0,018aA	0,158 $\pm$ 0,018aA	0,156 $\pm$ 0,010bA	0,433 $\pm$ 0,053bB	0,509 $\pm$ 0,026aB
	pH pele	0,147 $\pm$ 0,012aA	0,156 $\pm$ 0,014aA	0,151 $\pm$ 0,018aA	0,168 $\pm$ 0,013aA	1,037 $\pm$ 0,755aB	0,502 $\pm$ 0,033aA
Fração III	pH amostra	0,271 $\pm$ 0,098aA	0,267 $\pm$ 0,111aA	0,288 $\pm$ 0,113aA	0,361 $\pm$ 0,017aA	0,782 $\pm$ 0,104aB	0,791 $\pm$ 0,089aB
	pH pele	0,148 $\pm$ 0,003bA	0,163 $\pm$ 0,012bA	0,189 $\pm$ 0,054bB	0,198 $\pm$ 0,013bA	0,549 $\pm$ 0,053bB	0,542 $\pm$ 0,023bB
Fração IV	pH amostra	0,153 $\pm$ 0,003aA	0,167 $\pm$ 0,002aA	0,156 $\pm$ 0,003aA	0,283 $\pm$ 0,032aA	0,629 $\pm$ 0,089aB	0,616 $\pm$ 0,041aB
	pH pele	0,147 $\pm$ 0,003aA	0,156 $\pm$ 0,002aA	0,150 $\pm$ 0,008aA	0,216 $\pm$ 0,015bA	0,563 $\pm$ 0,009bB	0,577 $\pm$ 0,057bB

^aDados indicam media ($\pm$ DP) para 4 repetições, onde letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey, Antocianinas foram expressas em μg do equivalente cianidina 3-glicosídeo / 100g fração ou extrato, ^b pH 4,0 da pele alterado com tampão, ^c Exposto à luz combinado com temperatura de 37 ° C; ^d Protegido da luz combinado com a temperatura de 4 ° C,

A atividade antioxidante do extrato purificado e das frações de maçã cv. Gala foi medida durante os estudos de estabilidade ao pH, luz, temperatura e tempo de armazenamento. Desta forma, foi observado que, tanto em condições normais, como nas condições ótimas de armazenamento, com valores diferentes entre a alteração de pH, a atividade antioxidante das amostras experimentais foi reduzida.

No extrato purificado houve uma redução de até 60% nas primeiras 48h nas condições normais de armazenamento e pH da amostra e no pH da pele houve redução de 49%. Nas condições ótimas a redução foi menor de até 45% no pH da amostra e 40% no pH da pele. Já na fração I a redução foi maior no pH da pele mesmo no armazenamento ótimo. Houve redução da atividade em condições normais de armazenamento de 40% com pH da amostra e de 75% pH da pele e em condições ótimas de 30% para pH da amostra e 85% para pH da pele. A atividade antioxidante da fração II também demonstrou redução acima de 75% em todas condições de armazenamento e pH. A fração III demonstrou apenas 10% de redução na atividade nas condições ótimas de armazenamento. Fração IV mostrou menores reduções da atividade em pH da pele, enquanto que no pH da amostra perdeu 50% mais da atividade em condições ótimas ou normais de armazenamento.

Ainda, da mesma forma que para a determinação de compostos fenólicos totais, a atividade antioxidante foi mais expressiva nas frações III, IV e no extrato purificado.

Tabela 10. Atividade antioxidante total de extrato purificado e frações de maçã cv. *Gala* de acordo com alteração de pH, de luz e tempo de armazenamento.

Fração ou extrato	Tratamento ^b	Atividade antioxidante durante o armazenamento ^a					
		Normal ^c			Ótimo ^d		
		0h	24h	48h	0h	24h	48h
Extrato purificado	pH amostra	746,9±146,9bA	545,7±104,7bA	283,7±162,4bB	619,8±241,2aB	1144,7±188,1aA	357,1±104,2aB
	pH pele	1072,5±149,3aA	968,6±102,5aA	532,2±150,8aB	461,3±64,1aA	472,3±84,8bA	310,5±43,5aA
Fração I	pH amostra	12,8±0,7bA	6,7±0,7aA	7,6±10,4aA	36,6±11,1Ab	65,8±17,1aA	28,9±12,9aB
	pH pele	24,5±1,3aA	13,1±1,4aB	6,0±1,7Ab	14,9±2,5bA	10,8±2,5bA	2,2±1,0bA
Fração II	pH amostra	111,5±106,3aA	22,4±6,6aB	15,7±5,6aB	20,3±8,0bA	13,8±11,3aA	4,0±2,6aA
	pH pele	14,1±4,7aA	8,5±10,7aA	3,6±1,6Aa	304,9±9,8aA	31,6±1,5aB	36,4±17,2aB
Fração III	pH amostra	777,8±81,6aA	713,7±93,3aA	463,9±317,0aA	579,8±90,3aA	616,3±100,1aA	397,4±59,5aA
	pH pele	949,2±461,6aA	628,2±34,0aA	553,3±358,7aA	418,1±104,2aA	621,8±40,3aA	391,8±285,1aA
Fração IV	pH amostra	2083,4±940,4aA	1190,0±153,1aB	1056,8±378,7aB	954,8±113,1aA	1259,1±206,9aA	386,6±321,9aB
	pH pele	747,4±89,0bA	815,6±135,2aA	711,6±398,1aA	358,3±21,3bAB	710,9±48,1bA	272,6±98,3aB

^a Dados indicam media (± DP) para 4 repetições onde letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey, Atividade antioxidante foi expressa em ug equivalente trolox/mg fração ou extratos, ^b pH 4,0 da pele alterado com tampão, ^c Exposto à luz combinado com temperatura de 37 ° C; ^d Protegido da luz combinado com a temperatura de 4 ° C.

Estudos com separação de extratos por fracionamento e purificação são escassos na literatura científica, o que limitou a comparação de dados. Neste item de estabilidade foram realizadas algumas comparações entre armazenamento de extratos de frutas.

A estabilidade do perfil fenólico pode ser afetada por diversos fatores como pH, temperatura de armazenamento, estrutura química, concentração, luz, oxigênio, solventes, presença de enzimas, proteínas e íons metálicos, tanto em frutas quanto em extratos (REIN, 2005). Estudos com extratos demonstram que a decomposição de ácidos fenólicos aumenta com o aumento da temperatura e com o aumento do tempo de exposição (CHENG et al., 2014). Os ácidos cafeico, clorogênico e gálico não são estáveis em pH alto. Em particular, o ácido clorogênico é estável em pH ácido e a temperatura elevada. Já a catequina, epigallocatequina, ácido ferúlico, rutina e ácido trans-cinâmico são resistentes a degradação induzida por pH alto (FRIEDMAN; JÜRGENS, 2000).

6.3 Atividade biológica do extrato purificado e das frações de maçã cv. Gala

6.3.1 Efeitos na prevenção e no tratamento do câncer

Entre os fatores de risco para o melanoma, a exposição natural aos raios UV é o principal agente mutagênico com propriedades de ser um iniciador ou promotor tumoral (D'ORAZIO et al., 2013). Tratamentos tradicionais de câncer de pele, incluem cirurgia, radioterapia e quimioterapia, causam efeitos colaterais, principalmente, pela perda da função celular normal devido ao direcionamento inespecífico dos tratamentos. Assim, há uma busca constante por novos métodos anticancerígenos e fármacos que sejam mais específicos para o tumor e menos invasivos ao paciente (ZHAO; HE, 2010).

De acordo com os resultados apresentados na tabela 11, o potencial citotóxico foi expresso em porcentagem de células mortas em comparação ao controle e classificadas em baixa, moderada ou elevada citotoxicidade em fibroblastos. O extrato purificado apresentou citotoxicidade na faixa de concentração de 25 a 0,098 % (p/v ou peso/volume), as quais foram responsáveis por uma redução de até 77% da viabilidade celular. Na faixa de concentração de 0,049 a 0,024% (p/v), o extrato apresentou citotoxicidade moderada, mantendo a taxa de viabilidade celular acima de 65%. A partir da concentração de 0,012 até a concentração de 0,0002 % (p/v) o extrato apresentou citotoxicidade pouco importante

ou negligível, mantendo a viabilidade celular próxima ou superior a 100% quando comparada ao controle. Assim, o extrato purificado é seguro para aplicação em culturas celulares na faixa de concentração que varia de 0,003 a 0,0002 % (p/v), concentrações as quais possuem citotoxicidade negligível ou pouco importante. Todas as concentrações foram estatisticamente significantes quando comparados ao controle.

Viabilidade celular realizada a partir do ensaio cristal violeta em células de fibroblastos também foi realizado. Todas as concentrações testadas *in vitro* demonstraram uma alta viabilidade celular protegendo o DNA das células, sendo 0,012% (p/v), a concentração que apresentou a maior proteção ao DNA, aumentando em 27%, em relação ao controle (Tabela 11). O extrato purificado de maçã cv. Gala foi capaz de proteger significativamente o DNA das células de fibroblastos, quando comparamos ao grupo controle (não-tratado).

Tabela 11. Efeito do extrato purificado de maçã cv. Gala na viabilidade e na citotoxicidade celular em tratamentos com diferentes concentrações.

Concentrações (% p/v)	% Citotoxicidade*	p	% Viabilidade celular**	p
0,049	108,15±1,56	<0,01	59,29±2,67	<0,01
0,024	112,00±0,77	<0,01	51,21±2,77	<0,01
0,012	118,57±1,49	<0,01	27,35 ±2,76	<0,01
0,006	113,41±2,51	<0,01	15,65 ±3,34	<0,01
0,0024	117,12±2,46	<0,01	-4,02±7,52	<0,01
0,0015	127,99±4,00	<0,01	-15,95±9,16	<0,01
0,0008	119,84±1,08	<0,01	-32,08±4,86	<0,01
0,0004	120,83±1,88	<0,01	-32,95 ±1,04	<0,01

*Resultados do MTT expressos em média ± DP (n=3) para fibroblastos incubados por 48h e comparados com o controle (DMEN). **Resultados do ensaio de Cristal violeta expressos em média ± DP (n=3) para células incubadas por 24 h e comparadas com o controle (DMEN); Médias comparadas com o controle pelo ANOVA, Dunnet.

Ensaio de citotoxicidade foram realizados também nas frações fenólicas, previamente ao ensaio cometa, através do método 3-4,5 dimethylthiazol-2, 5 diphenyl

tetrazolium bromide, o MTT. Para o ensaio do cometa, foram utilizadas as três concentrações mais altas que apresentaram citotoxicidade menor ou insignificante no ensaio MTT.

Utilizando fibroblastos, houve redução na formação de cometas quando os fibroblastos foram incubados com o extrato purificado (Figura 13A). A partir disto, este extrato foi combinado com radiação ultravioleta onde a redução em 14, 23 e 34% do dano ao material genético foi verificada quando comparado ao grupo controle irradiado, nas concentrações de 0,0024, 0,0012 e 0,0006% (p/v). A fração I submetida à radiação UV apresentou menor dano ao DNA quando comparada ao grupo controle irradiado, nas concentrações de 0,313 e 0,156% (p/v), reduzindo em 8 e 13%, respectivamente (Figura 13B). A fração II conseguiu reduzir a formação de danos ao material genético em até 19% (Figura 13C). A concentração de 0,013% (p/v) da fração III e da fração IV reduziram os danos ao DNA em 17%, já em concentrações maiores, de 0,051 e 0,026 mg / mL, reduziram em 8% (Figura 13D) e 22% (Figura 13E), respectivamente.

Neste estudo, investigou-se, além da viabilidade e da citotoxicidade, a atividade de proteger o dano ao DNA após a irradiação de culturas celulares. Os dados de redução de danos ao DNA despertam grande atenção para os extratos concentrados e já foram observados em ações tópicas in vivo como dermatite em camundongos (NOH et al., 2008) e danos por UV (SEVIN et al., 2007). As ações de proteção ao DNA dos extratos podem estar ligada aos flavonoides pois estes exercem amplos efeitos anti-inflamatórios e antiproliferativos em fibroblastos (GONZÁLEZ et al., 2011).

Os fenólicos da maçã mostram alta capacidade antioxidante *in vitro* e se correlacionam razoavelmente bem com o estado antioxidante do sangue (KAHLE; KRAUS; RICHLING, 2005). Existem variações estruturais substanciais dos compostos fenólicos que têm impacto sobre seu perfil biológico e, especificamente, sobre seus efeitos nas condições inflamatórias (GONZÁLEZ et al., 2011). Como demonstrado no perfil cromatográfico a maçã é rica em substâncias antioxidantes, e tem sido associada à prevenção de oncogêneses. Produtos cosméticos produzidos a partir desses extratos são promissores no tratamento do melanoma, como tratamento tópico alternativo. Neste sentido, o extrato purificado e as frações foram testadas em células de fibroblastos e de melanoma.

O extrato purificado demonstrou uma citotoxicidade significativa na concentração de 0,049% (p/v), sendo que esta foi reduzindo de acordo com a redução da concentração

testada. A viabilidade celular foi próxima ou maior que 100% quando comparada ao controle, sendo a concentração de 0,0024% (p/v) a primeira concentração não citotóxica do extrato. A partir desta concentração foram realizados testes com UV (Figura 14).

A formação de danos ao DNA em cultura de fibroblastos humanos submetidos à radiação ultravioleta (UVA) está demonstrada na figura 14A. O grupo controle submetido à radiação UV apresentou comet score significativamente superior em relação ao grupo controle basal (não irradiado) ($P < 0.0001$) para o extrato purificado I. Ademais, o grupo tratado com o e submetido à radiação UV, apresentou menor formação de danos ao DNA quando comparado ao grupo controle irradiado, nas concentrações de 0,0024, 0,0012 e 0,0006% (p/v). Logo, o extrato purificado foi capaz de reduzir em 14, 23 e 34%, respectivamente, a formação de danos ao material genético, ficando evidente a capacidade do produto reduzir a fragmentação do DNA induzida pela radiação ultravioleta em cultura de fibroblastos humanos.

Outros estudos também demonstram que extratos fenólicos de diferentes espécies tem poder de proteger células de fibroblastos frente a radiação UV, aumentando a viabilidade celular e diminuindo danos ao DNA, como é o caso de extratos de morango (GIAMPIERI et al., 2012) e de extratos de cravo (PATWARDHAN; BHATT, 2015). Neste sentido, o extrato purificado pode ser utilizado como agente fotoprotetor.

O efeito radioprotetor de dois fitoquímicos, ácido quínico e ácido clorogênico, contra a instabilidade genômica induzida por irradiação de raios X em linfócitos humanos não-tumorigênicos foi estudado por Cinkilic et al. (2013). A capacidade protetora contra o dano ao DNA induzido pela radiação foi avaliada usando o ensaio cometa alcalino em linfócitos sanguíneos humanos isolados de dois doadores humanos saudáveis. O ácido quínico diminuiu a presença de danos no DNA induzidos por irradiação em 5,99 a 53,57% e o ácido clorogênico em 4,49 a 48,15%.

A figura 14B o tratamento com a fração I, nas concentrações de 0,625, 0,313 e 0,156% (p/v), e submetido à radiação UV, apresentou menor formação de danos ao DNA quando comparado ao grupo controle irradiado, nas concentrações de 0,313 e 0,156% (p/v). Assim, a ela foi capaz de reduzir em 8 e 13%, respectivamente, a formação de danos ao material genético ficando evidente a capacidade do produto reduzir a fragmentação do DNA induzida pela radiação ultravioleta em cultura de fibroblastos humanos.

Na figura 14C o tratamento com a fração II, e submetido à radiação UV, apresentou menor formação de danos ao DNA quando comparado ao grupo controle irradiado, nas concentrações avaliadas (0,156, 0,078 e 0,039% (p/v), reduzindo em até 19% a formação de danos ao material genético.

O tratamento com a fração III está representada na figura 14D onde nas concentrações de 0,051, 0,026 e 0,013 mg/mL, as células tratadas e submetidas à radiação UV, apresentaram menor formação de danos ao DNA quando comparado ao grupo controle irradiado, na concentração de 0,013 mg/mL. Houve redução de 17% a formação de danos ao material genético na concentração de 0,013% (p/v).

Na figura 14E, a formação de danos ao DNA em cultura de fibroblastos humanos submetidos à radiação ultravioleta (UVA) e grupo controle submetido à radiação UV apresentou comet score significativamente superior em relação ao grupo controle basal (não irradiado) ($P < 0.0001$). Ademais, o grupo tratado com a fração IV, nas concentrações de 0,103, 0,051 e 0,026 mg/mL, e submetido à radiação UV, apresentou menor formação de danos ao DNA quando comparado ao grupo controle irradiado, nas concentrações de 0,051 e 0,026 mg/mL. Logo, a fração IV foi capaz de reduzir em 8 e 22%, respectivamente, a formação de danos ao material genético. Dessa forma, fica evidente a capacidade do produto reduzir a fragmentação do DNA induzida pela radiação ultravioleta em cultura de fibroblastos humanos.

A exposição à radiação UV-A (315 a 400 nm) da pele também é conhecida por induzir lesões discretas no DNA e a geração de radicais livres que levam a uma ampla gama de doenças da pele, incluindo câncer de pele. Portanto, sabe-se que, por conta disso, a radiação UV é um conhecido carcinógeno envolvido no desenvolvimento de câncer de pele não melanoma e melanoma (RAMASAMY et al., 2017).

Especialmente nos cânceres da pele, os compostos presentes nesta fruta podem ser bem utilizados na prevenção dos danos causados pela radiação ultravioleta. O risco ao longo da vida para o câncer de pele melanoma é aumentado pela exposição à luz UV natural e artificial e reduzido pela proteção solar (MOSHAMMER; SIMIC; HALUZA, 2017).

Rastogi et al. (2010) relatam que os danos ao DNA resultam em desincorporação de bases durante o processo de replicação, dano hidrolítico, o que resulta em desaminação de bases, depurinação, dano oxidativo, causado pela interação direta de radiações ionizantes com as moléculas de DNA, bem como mediada por radicais livres induzidos por

radiação UV ou espécies reativas de oxigênio, e agentes alquilantes (usado no tratamento do câncer que liga um grupo alquila ao DNA) que podem resultar em bases modificadas. A radiação UV-B é um componente menor do espectro solar que atinge a população, mas é mais eficaz em causar queimaduras solares, envelhecimento, reações imunes e câncer de pele, especialmente pela formação de fotossensibilizadores e leva à formação de radicais livres. O DNA pode absorver o UV-B levando diretamente à formação de rupturas em sua cadeia, além de lipídios e proteínas e por isso, a proteção contra esta radiação é muito importante. O dano ao DNA induzido por estresse oxidativo pode ser devido à absorção direta de UV-B pelo DNA ou pela formação de ROS (PATWARDHAN; BHATT, 2015).

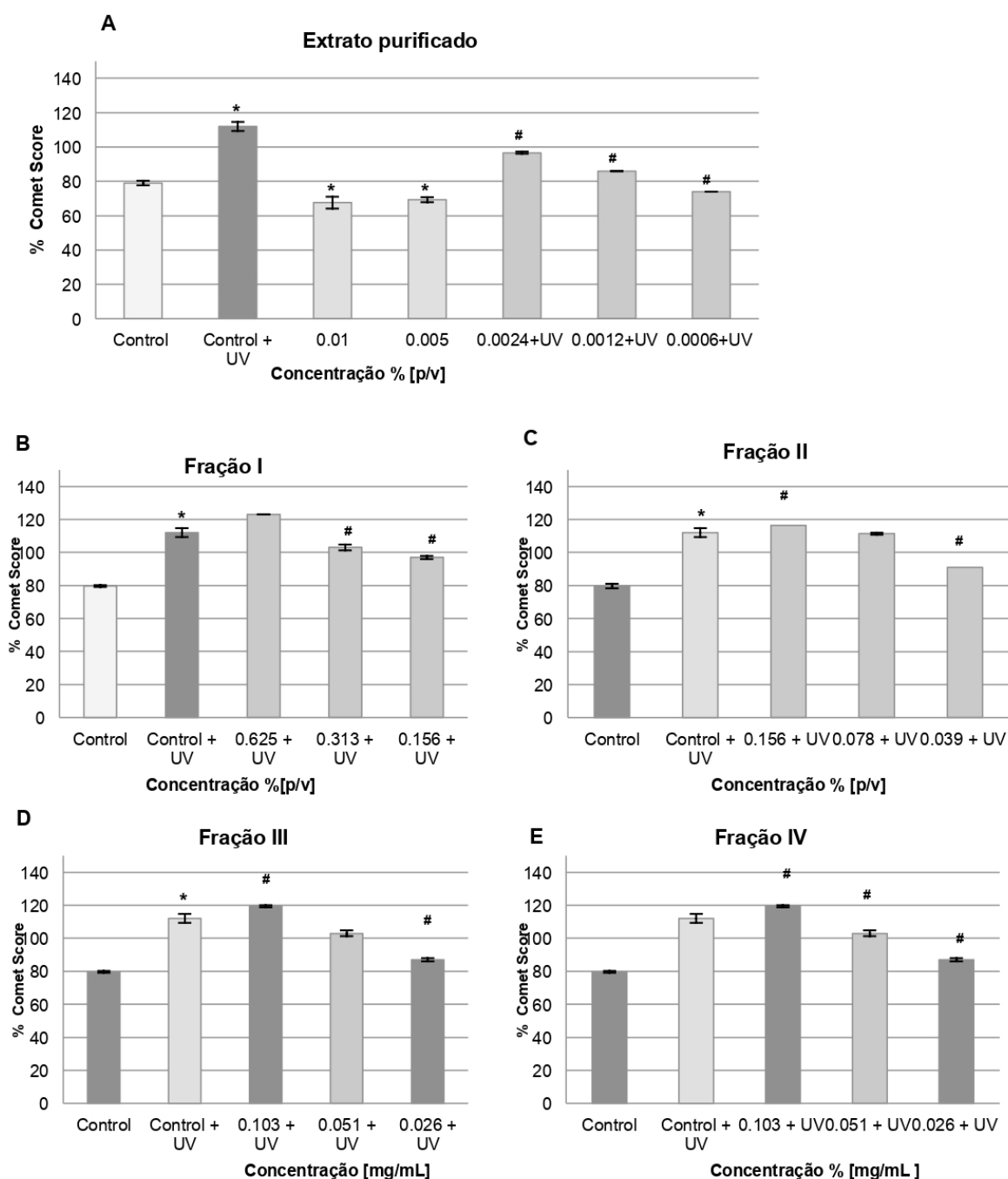


Figura 14. Ensaio Cometa (Comet Score) em culturas de fibroblastos humanos submetidos à radiação ultravioleta e incubados com frações e extrato. A: extrato purificado com e sem UV; B: Fração I; C: Fração II; D: Fração III; E: Fração IV; UV: ultravioleta; Controle: DMEN; Controle + UV: DMEN combinado com radiação ultravioleta. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de três experiências independentes. * $p < 0,01$, em relação ao controle; # $p < 0,01$ em relação ao controle UV (ANOVA, Dunnet).

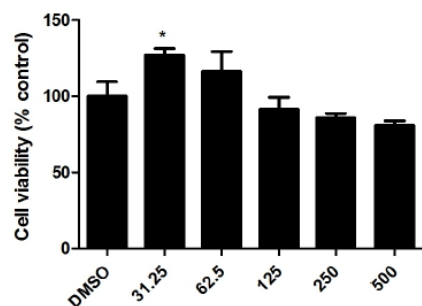
Ceymann et al. (2012) garantem que maçãs têm atividades antioxidantes e antiproliferativas potentes devido aos seus fitoquímicos da casca. A biodisponibilidade de polifenóis pode ser influenciada pela presença de outros polifenóis e a composição e o conteúdo de compostos fenólicos em um produto ou alimento também podem ser aprimorados por métodos de processamento ou por reformulação com outros componentes (MCDOUGALL et al., 2017).

A figura 15 mostra a viabilidade celular de fibroblastos humanos após 72h de tratamento com extrato purificado e frações fenólicas. A menor concentração testada do extrato purificado mostrou associação significativa quando comparado ao controle. A fração 1, contendo ácidos fenólicos, apresentou viabilidade em 31,25 ug/mL e em 62,5 ug/mL, em concentrações maiores não apresentou viabilidade. Pelo contrário, as frações III e IV só demonstraram viabilidade em concentrações maiores, com significância estatística quando comparados ao controle. Os resultados em células de fibroblastos foram promissores e indicam que estes compostos poderiam ser utilizados em tratamento contra melanomas que não causaria mal para as células fibroblásticas humanas. Tendo uma seletividade para o melanoma se forem efetivas na morte celular destas.

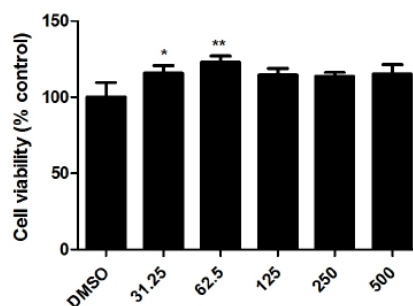
Compostos de polifenol e triterpenóide foram fracionados de folhas da *Eugenia florida* derivada da família myrtaceae indicando que atividade citotóxica contra células leucêmicas mielóides (K562), mas não de melanoma humano (SK-Mel-28), mesmo em elevadas concentrações. Os autores sugerem que este potencial estaria associado mais de uma classe de metabólitos secundários, uma vez que as maiores atividades foram encontradas em frações oriundas de solventes muito distintos (SANTOS et al., 2018)

O melanoma se desenvolve a partir dos melanócitos que, por sua vez, migram da crista neural para toda a epiderme durante a embriogênese. Esta crista neural, expressa tirosinase uma enzima chave na via de pigmentação que é altamente ativa em células de melanoma. Em consequência desse fato, o tumor apresenta grande capacidade de metastatização mesmo em fases iniciais já, que a característica de invadir e disseminar poderiam ser consideradas uma prerrogativa inata deste tipo celular. Esta enzima referida metaboliza compostos fenólicos, tornando um possível alvo para terapias baseadas em fitoquímicos (WAINSTEIN; BELFORT, 2004; HARRIS et al., 2016).

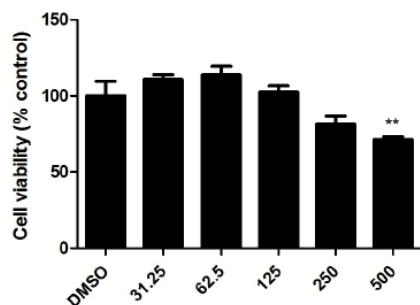
Extrato purificado



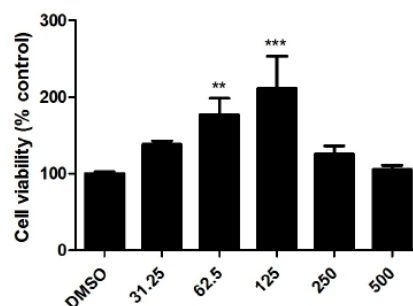
Fração I



Fração II



Fração III



Fração IV

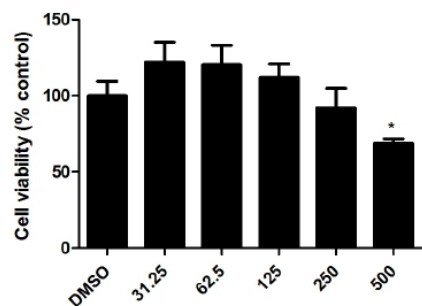


Figura 15. Viabilidade celular sob efeito do extrato purificado e das frações em culturas de MRC-5 em 72h. Os valores estão apresentados em média referente a três repetições representados em % viabilidade celular. As concentrações estão em ug/mL em relação ao controle DMSO na fração III e DMEN outras unidades. *p < 0,01, **p < 0,01, **** p < 0,01 (ANOVA, Dunnet).

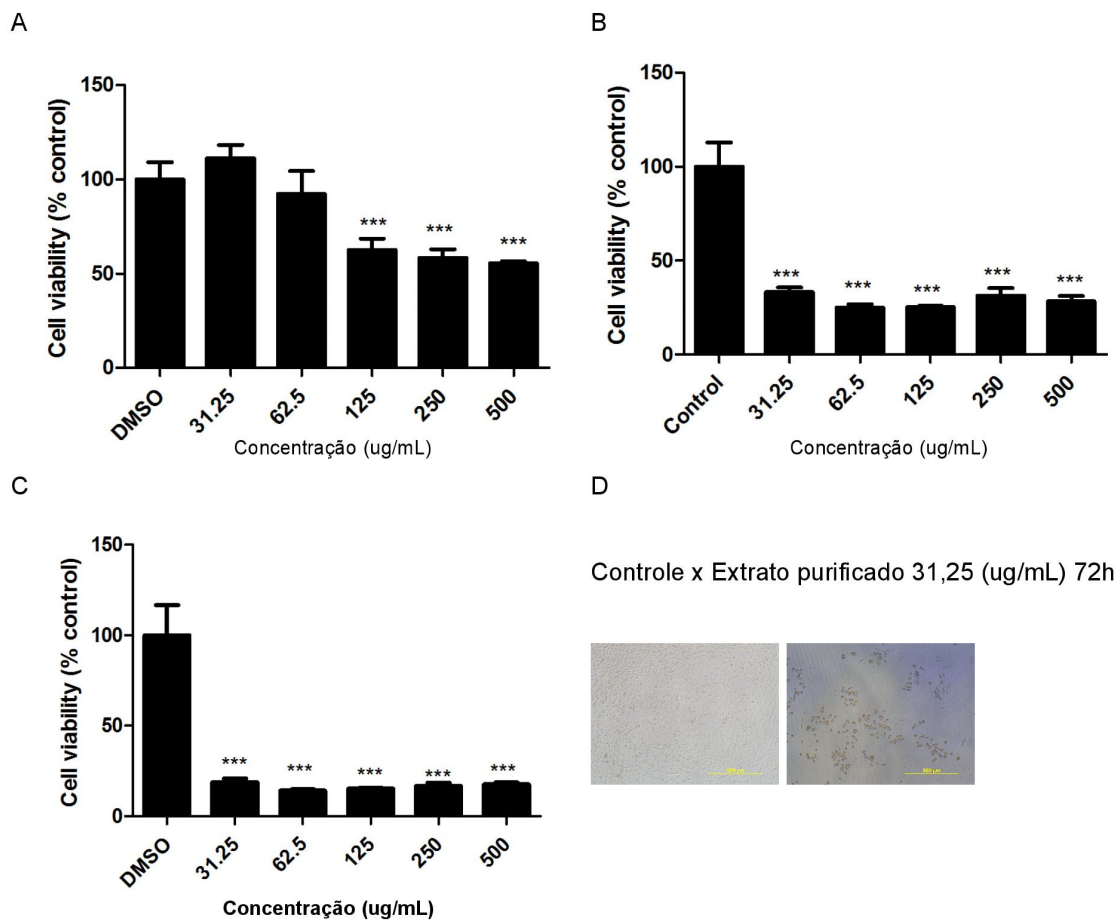


Figura 16. Morte celular após tratamento com extrato purificado em culturas de B16F10 em 24h (A), 48h (B) e 72h (C). D: imagem controle X extrato purificado. Os valores estão apresentados em média referente a três repetições representados em % viabilidade celular. As concentrações estão em ug/mL, em relação ao controle DMSO na fração III e DMEN outras unidades *p <0,01, **p <0,01, **** p <0,01 (ANOVA, Dunnet).

A figura 16 apresenta dados de morte celular após tratamento com extrato purificado em culturas de B16F10 em até 72h. Os dados revelam que em 24 h houve morte celular acima da concentração de 125 ug/mL, com diferença significativa quando comparado ao controle, porém em 48h e 72h já houve significativa redução da viabilidade celular dos melanomas em todas as concentrações. Quatro flavonols, dois ácidos hidroxinâmicos e três dihidrochalconas estavam presentes no extrato purificado, dentre florentinas, procianidinas, quercetinas, amigdalinas, ácidos clorogênico e ácidos p-coumaroilquínico.

A galangina, fenólico do própolis, diminuiu significativamente a viabilidade celular das células B16F10 e induziu a apoptose celular (ZHANG et al., 2012).

Somente na maior concentração o extrato purificado apresentou morte celular em melanoma humano (figura 17).

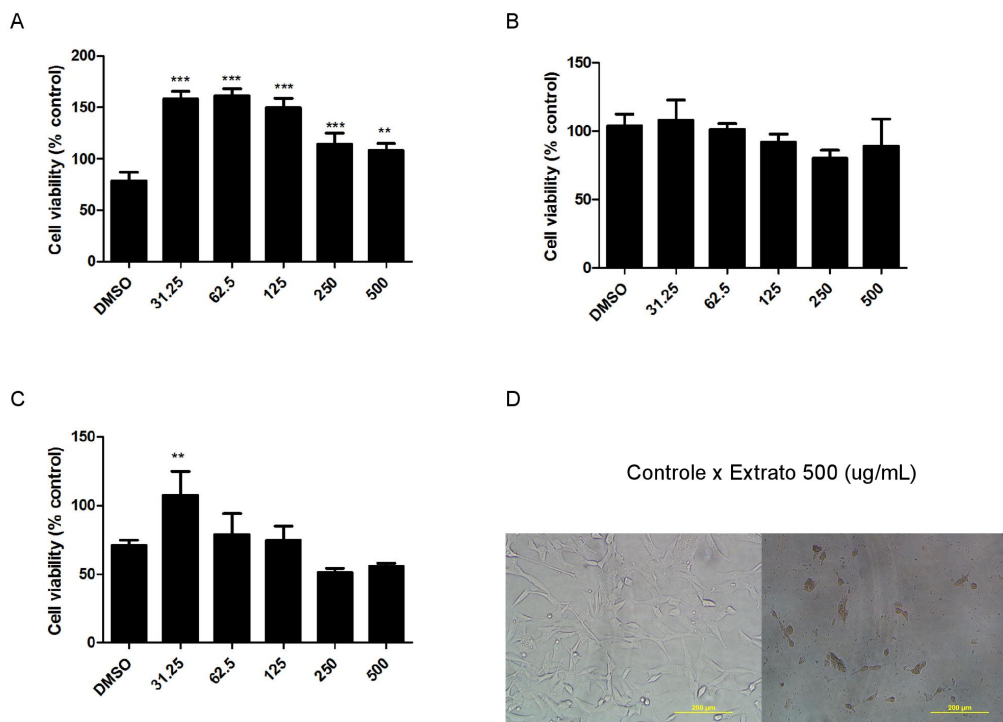


Figura 17. Morte celular após tratamento com extrato purificado em culturas de SK-Mel-103 em 24h (A), 48h (B) e 72h (C). D: imagem controle x extrato. Os valores estão apresentados em média referente a três repetições representados em % viabilidade celular. As concentrações estão em ug/mL, em relação ao controle DMSO na fração III e DMEN outras unidades *p <0,01, **p <0,01, **** p <0,01 (ANOVA, Dunnet).

A morte celular de melanócitos não foi expressiva após tratamento com extrato purificado. Em 72h houve redução da viabilidade celular, porém sem significância estatística. Linhagem celular de melanoma SK-MEL-28 tratada com extrato etanólico rico em fenólicos do pericarpo de mangostão demonstrou apoptose aumentada após tratamento (WANG et al., 2012).

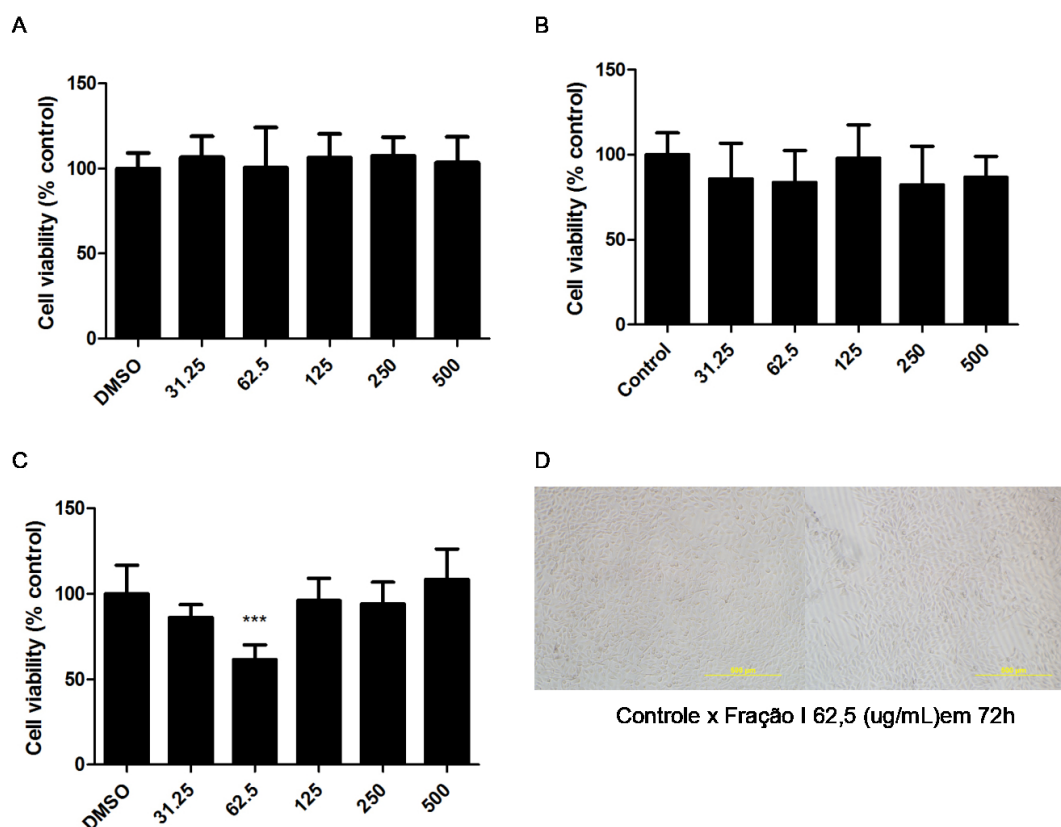


Figura 18. Morte celular após tratamento com fração I em culturas de B16F10 em 24h (A), 48h (B) e 72h (C). Os valores estão apresentados em média referente a três repetições representados em % viabilidade celular. As concentrações estão em ug/mL, em relação ao controle DMSO na fração III e DMEN outras unidades *p <0,01, **p <0,01, **** p <0,01 (ANOVA, Dunnet). D: Controle X fração I.

O tratamento com a fração I não demonstrou morte celular em 24h, 48h e 72h, exceto em 72h na concentração de 62,5 ug/mL (figura 18). Na fração I, foi possível identificar ácido málico, que é um hidroxicinâmico. Outros ácidos hidroxicinâmicos tem potencial agente anticarcinogênico (KUDUGUNTI et al., 2010). Chrysin (5,7-dihydroxyflavone) foi carcinogênico contra células de melanoma B16F10 com efeito dose resposta tendo efeito altamente apoptótico e na paragem do ciclo celular (SASSI et al., 2018)

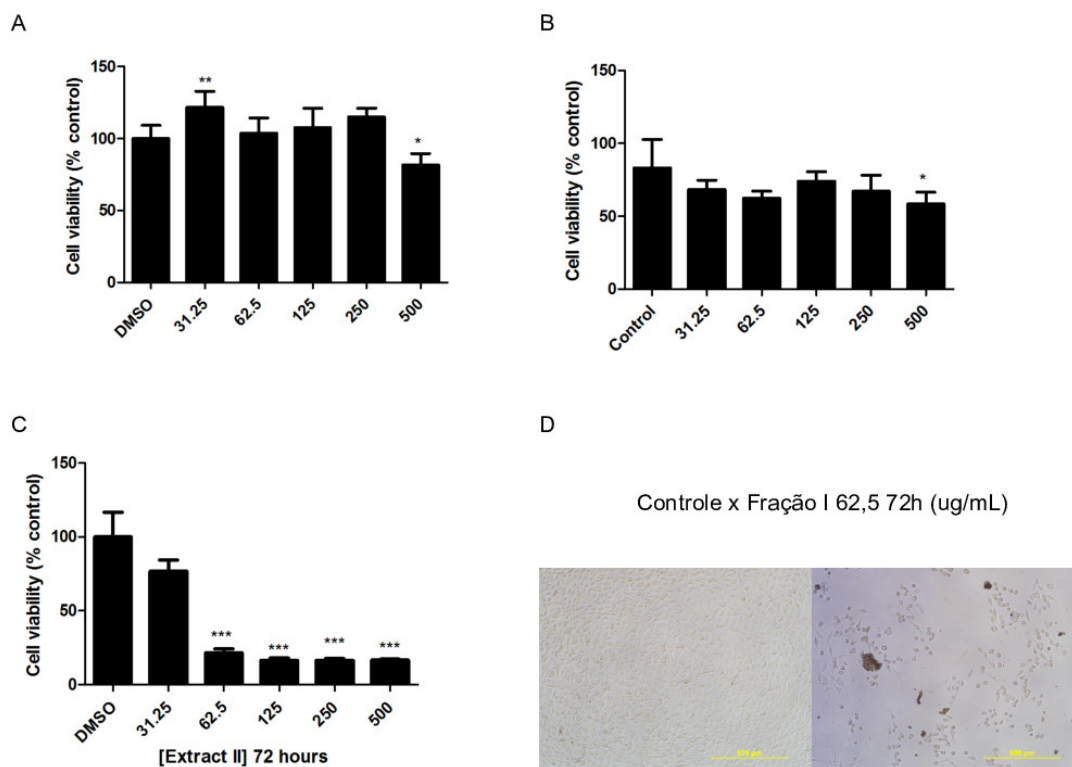


Figura 19. Morte celular após tratamento com fração II em culturas de B16F10 em 24h (A), 48h (B) e 72h (C). D: imagem controle x fração I. Os valores estão apresentados em média referente a três repetições representados em % viabilidade celular. As concentrações estão em ug/mL, em relação ao controle DMSO na fração III e DMEN outras unidades *p <0,01, **p <0,01, **** p <0,01 (ANOVA, Dunnet).

A fração II possibilitou a morte de células de melanoma após tratamento de 72h nas concentrações acima de 62,5 ug/mL (figura 19). Nesta fração os compostos identificados foram ácidos hidroxinâmicos, flavonols e flavonona. Uma das maneiras de atacar uma célula de câncer é a ação destes compostos pela neutralização de radicais livres produzidos pelas células cancerígenas ou ainda prevenir distúrbios degenerativos derivados do estresse oxidativo persistente neste ambiente (MAJO et al., 2008).

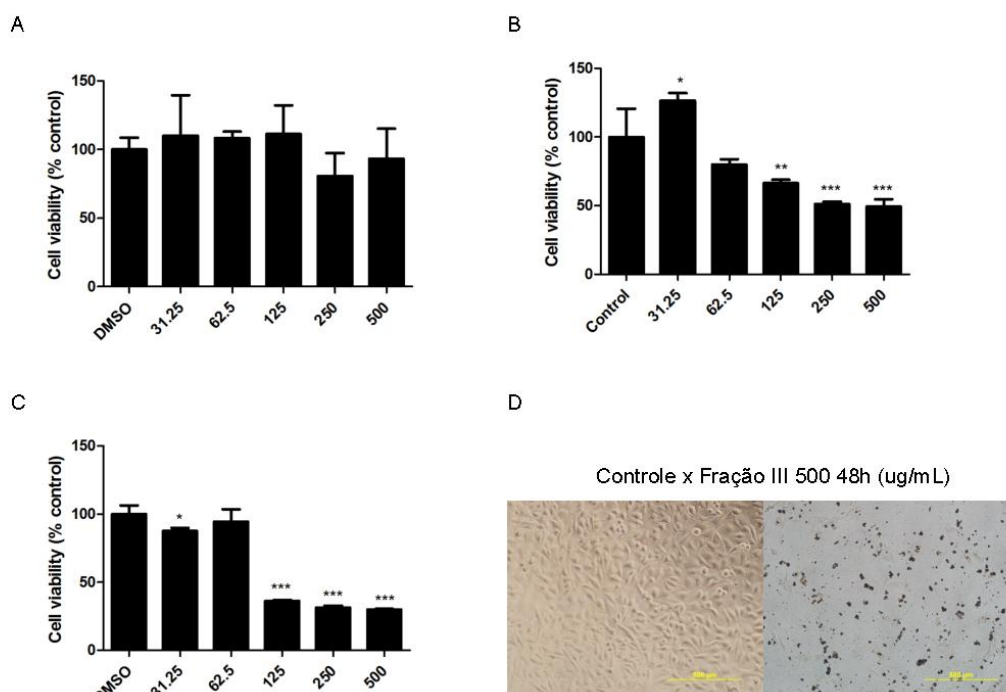


Figura 20. Morte celular após tratamento com fração III em culturas de B16F10 em 24h (A), 48h (B) e 72h (C). D: imagem controle x fração III. Os valores estão apresentados em média referente a três repetições representados em % viabilidade celular. As concentrações estão em ug/mL, em relação ao controle DMSO na fração III e DMEN outras unidades *p <0,01, **p <0,01, **** p <0,01 (ANOVA, Dunnet).

A figura 20 demonstra o tratamento com fração III de culturas de B16F10 e é possível verificar que em 72h nas três maiores concentrações esta fração é capaz de aumentar morte celular de melanoma.

Harris et al. (2016) sugerem que a quercetina, identificada nesta fração, pode ser usada para atingir o melanoma durante a melanogênese, pois a quercetina demonstra atividades antiproliferativas e pró-apoptóticas em vários tipos de células cancerosas. Ela é prontamente metabolizada pela tirosinase em vários compostos que promovem a atividade anticancerígena; adicionalmente, dado que a expressão da tirosinase aumenta durante a tumorigênese, e sua atividade está associada com alterações de pigmentação em lesões melanocíticas em estágio inicial e tardio. Ela induz cascatas de sinalização que levam à indução de vias antitumorais e em maiores concentrações induz danos celulares como a produção de adutos pró-oxidantes e a alteração do potencial de glutathiona ou biorredução (HARRIS et al., 2016).

Snyder et al. (2016) trataram camundongos com extrato de casca de maçã rico em polifenóis, extrato de maçã e quercetina incluindo uma dieta restritiva de lipídeos ou não. Concomitante, realizaram análises *in vitro* com células de hepatocarcinoma humano HepG2 expostas à quercetina (0-100 mmol / L) para determinar se a acumulação lípido intracelular pôde ser modulada por este fitoquímico. As concentrações de proteína C-reativa sérica, cuja concentração sanguínea se eleva radicalmente quando há indicativo de processos inflamatórios, foram reduzidas em 29% em camundongos alimentados com quercetina em comparação com controles e a quercetina mostrou reduzir acúmulo de lipídios intracelulares de maneira dose-dependente na cultura celular.

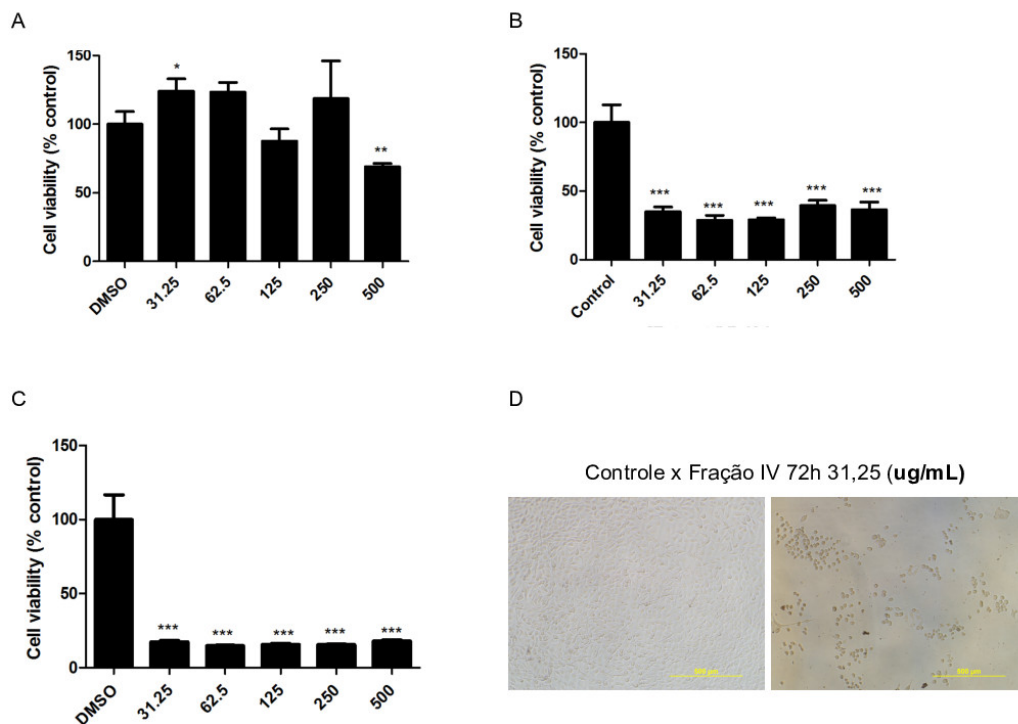


Figura 21. Morte celular após tratamento com fração IV em culturas de B16F10 em 24h (A), 48h (B) e 72h (C). D: imagem controle X fração IV. Os valores estão apresentados em média referente a três repetições representados em % viabilidade celular. As concentrações estão em ug/mL, em relação ao controle DMSO na fração III e DMEN outras unidades *p <0,01, **p <0,01, **** p <0,01 (ANOVA, Dunnet).

A figura 21 apresenta dados de morte celular de culturas B16F10 e nas 72h houve redução da viabilidade de células de melanoma em todas concentrações, sem aumentar percentual com aumento de concentração. Um composto identificado na fração III, na IV e

no extrato purificado foi o ácido clorogênico, que já é utilizado em produtos cosméticos. Ele foi testado em células de melanoma B16 e aumentou a melanogênese e diminuiu a atividade da tirosinase de células. Na planta, o ácido clorogênico é oxidado pela tirosinase, uma enzima polifenol oxidase, e é altamente reativo que interage com os grupos NH₂ de lisinas, grupos SCH₃ de metioninas e os anéis indol de triptofanos em adição nucleofílica e em reações de polimerização, as chamadas reações de escurecimento (LI et al., 2014).

Dihidrochalcona floretina possui farmacóforo de diidroxiacetofenona, um potente antioxidante relatado (RANA; BHUSHAN, 2016). Estudo sugere que a tirosinase desempenha um papel importante na toxicidade seletiva do ácido cafêico éster feniletílico em relação às linhagens de melanoma onde foram adicionados junto ao ensaio de MTT alguns moduladores com intuito de verificar a ação deste fenólico. Esta enzima é única nos melanócitos e é a principal envolvida na melanogênese. Ela foi utilizada como alvo molecular para o desenvolvimento de drogas anti-melanoma que poderiam ser bioativadas intracelularmente para seletivamente atingir as células malignas, poupando os tecidos normais desprovidos da enzima. Com isso, diferentes fenólicos, incluindo o ácido cafêico éster feniletílico, mais solúvel e com maior facilidade de atravessar membrana das células de melanoma para ser metabolizado pela tirosinase. A citotoxicidade dele ficou superior aos seguintes fenólicos IC₅₀ (48 h) frente a células SK-Mel-28: ácido dihidroxicinâmicos (5mM), ácido 4-hidroxi propiônico (1,5mM), ácido dihidroxicafeico (2,2mM), ácido 4-dihidroxicinâmicos (4,4mM), ácido cafeico (2,3mM), ácido ferulico (2mM), ácido clorogênico (>5mM), ácido dihidroxicinâmicos (2,8mM). Os autores sugerem que espécies intermediárias reativas, depleção de GSH intracelular, formação de ROS e toxicidade mitocondrial induzida contribuíram significativamente para a toxicidade de CAPE em células de melanoma (KUDUGUNTI et al., 2010).

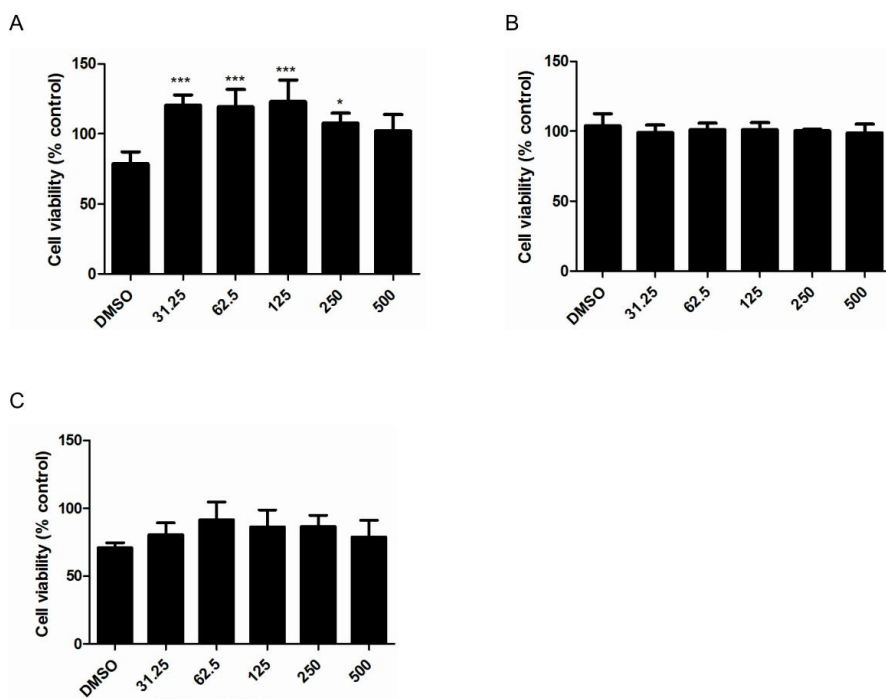


Figura 22. Morte celular após tratamento com fração I em culturas de SK-Mel-103 em 24h (A), 48h (B) e 72h (C). Os valores estão apresentados em média referente a três repetições, representados em IC50 (ug/mL), *p <0,01, **p <0,01, **** p <0,01 em relação ao controle DMSO (ANOVA, Dunnet).

O tratamento com fração I em células de melanoma possibilitou baixo percentual de morte celular (figura 22). Ácidos clorogênicos do café são altamente biodisponíveis apresentando limite de excreção de 30% de ácido clorogênico consumido dentro de 24 horas após a ingestão (VAUZOUR et al., 2010) então, resta investigar estas lacunas no conhecimento científico e a finalidade biológica mais propícia para sua utilização.

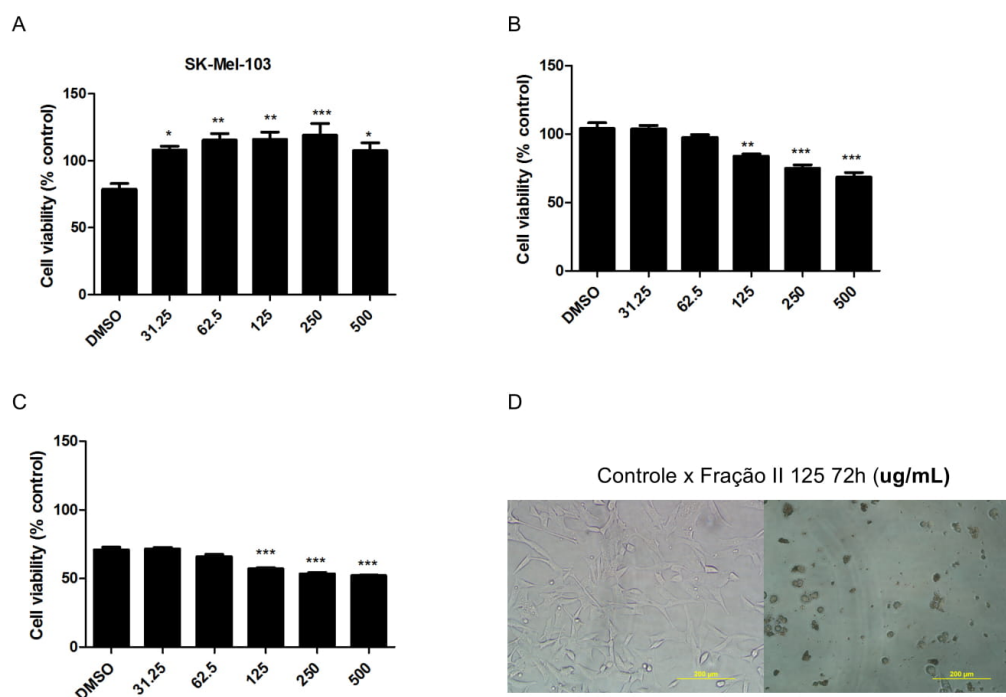


Figura 23. Morte celular após tratamento com fração II em culturas de SK-Mel-103 em 24h (A), 48h (B) e 72h (C). D: imagem controle X fração II. Os valores estão apresentados em média referente a três repetições, representados em IC50 (ug/mL), *p <0,01, **p <0,01, **** p <0,01 em relação ao controle DMSO (ANOVA, Dunnet).

A fração II, rica em ácidos hidrocínânicos, causou a morte celular de células de melanoma humano, principalmente, nas três concentrações mais elevadas (figura 23).

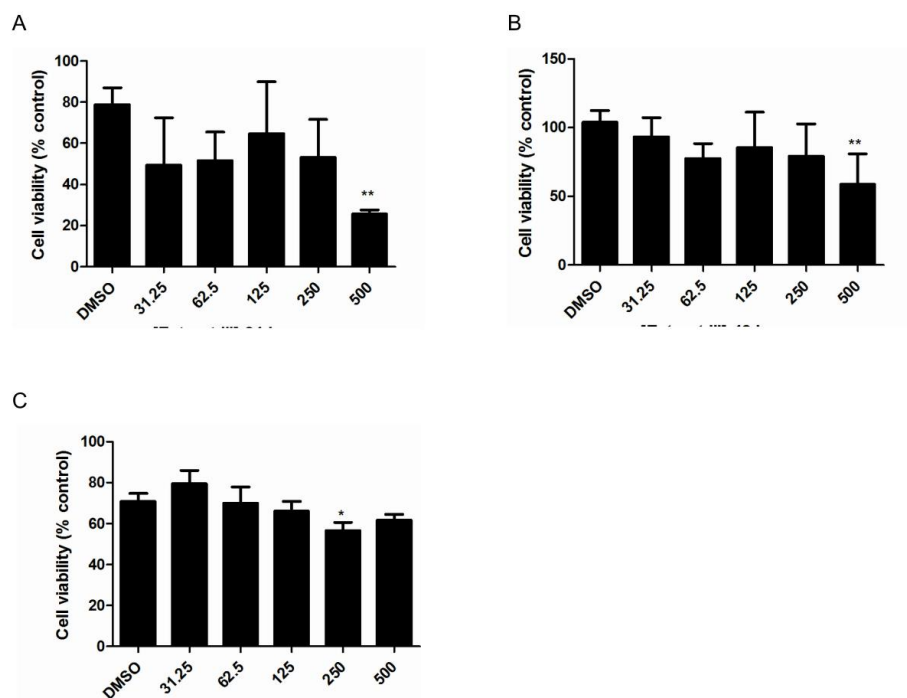


Figura 24. Morte celular após tratamento com fração III em culturas de SK-Mel-103 em 24h (A), 48h (B) e 72h (C). Os valores estão apresentados em média referente a três repetições, representados em IC50 (ug/mL), *p <0,01, **p <0,01, **** p <0,01 em relação ao controle DMSO (ANOVA, Dunnet).

Na figura 24, a fração III apresentou baixo percentual de morte celular para estas células de melanoma humano. Em 24h e 48h a maior concentração apresentou significativa redução da viabilidade celular comparado ao controle, e em 72 h somente na concentração de 250 ug/mL.

Os compostos identificados nesta fração, por exemplo o ácido cafeico, já foi reportado na literatura como redutor da viabilidade celular de melanoma humano (SK-Mel-28), especialmente, por indução da morte celular por apoptose, inibição da colônia de formação, modulação do ciclo celular e alterações na expressão gênica de caspases após o tratamento com o fenólico (PELINSON et al., 2019).

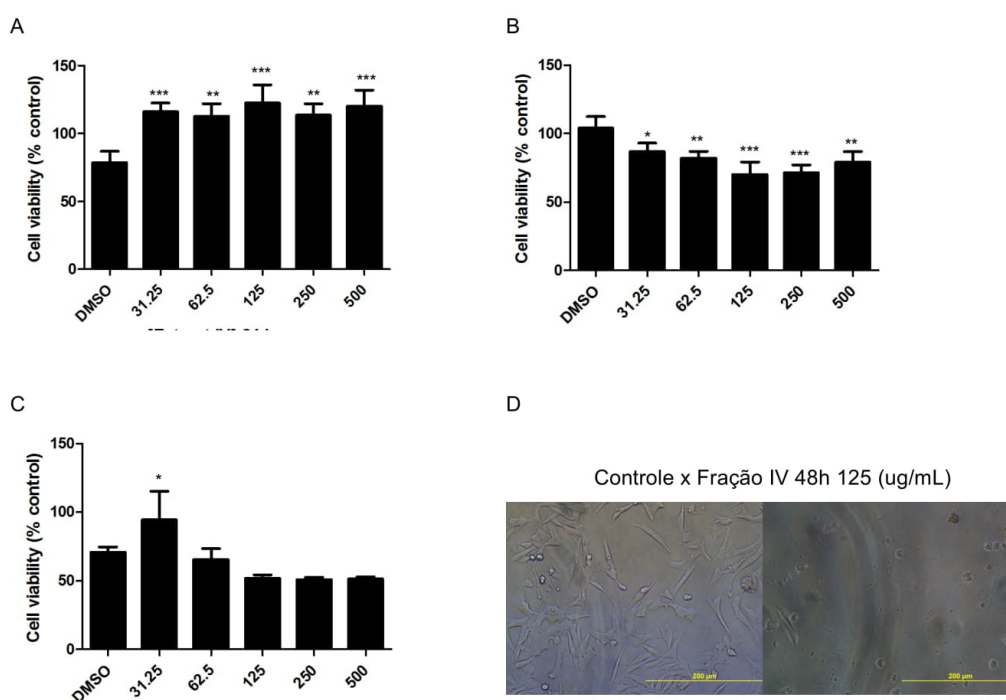


Figura 25. Morte celular após tratamento com fração IV em culturas de SK-Mel-103 em 24h (A), 48h (B) e 72h (C). D: imagem controle X fração IV. Os valores estão apresentados em média referente a três repetições, representados em IC50 (ug/mL), *p <0,01, **p <0,01, **** p <0,01 em relação ao controle DMSO (ANOVA, Dunnet). D:

Na figura 25, a fração IV foi a mais expressiva em capacidade de eliminação do radical DPPH comparada as outras frações. A quercetina, presente nesta fração, além da III e do extrato, também apresentaram este flavonol. Este composto é flavona hidroxilada no R1 com elevado poder antioxidante devido ao seu padrão de hidroxilação, em que se pensa que o OH aumenta a estabilidade do radical flavonóide formado assim que o composto age como um eliminador de radicais livres (LA ROSA et al., 2018). Maçãs cultivadas no Brasil (Porto Amazonas, PR) nas variedades Gala e Eva, os glicosídeos da quercetina, e o teor total de flavonóis, aumentaram com o amadurecimento e diminuíram com a senescência dos frutos (ALBERTI et al., 2017).

A quercetina já demonstra atividade antiproliferativa e pró-apoptótica em vários tipos de células cancerígenas, pois é prontamente metabolizada pela tirosinase em vários compostos que promovem a atividade anticâncer; adicionalmente, dado que a expressão da tirosinase aumenta durante a tumorigênese, e sua atividade está associada a alterações

de pigmentação em lesões melanocíticas de estágio inicial e tardio, sugere que a quercetina pode ser usada para atingir o melanoma (HARRIS et al., 2016).

As catequinas foram extraídas nesta fração. González et al., 2011 afirmam que os flavonóides, como quercetina (-)-epigallocatechin-gallate, ((-)-epigallocatechin parecem exercer amplos efeitos anti-inflamatórios e antiproliferativos nos fibroblastos pela inibição de sinalizadores da inflamação ou exerce efeitos protetores contra o estresse oxidativo em fibroblastos humanos.

A epicatequina do chá verde, também presente no extrato purificado e em frações, exceto na I, demonstra efeitos sobre a viabilidade de cultura de fibroblastos após radiação, sugerindo isso como um meio efetivo de reduzir danos celulares e facilitar a cicatrização de feridas à citotoxicidade induzida por radiação. A catequina protege contra a morte celular induzida por estresse oxidativo em fibroblastos, possivelmente pela inibição da fosforilação da p38 e a JNK demonstra um potencial como agente terapêutico para a prevenção do envelhecimento da pele (SHIN et al., 2014).

Além dela, o chá verde tem (-) - epigallocatequina, (-) - epicatequina-3-galato e (-) - epigallocatequina-3-galato inibem o crescimento celular SK-Mel 28 (7-29% às 24 h e 9-50% às 48 h) e induzem citotoxicidade em células de melanoma A375 e Hs294t pela diminuição das expressões de ciclinas e CDKs (CDK2, CDK4 e CDK6) da fase G1. Sugerindo que os polifenóis induzem uma ruptura acentuada da progressão descontrolada do ciclo celular em células de melanoma (PATEL; SHARMA, 2016). Outro estudo com este mesmo conjunto de polifenóis, inibiu significativamente a viabilidade celular bem como a capacidade de formação de colônias de células de melanoma de um modo dependente da dose, além de vários efeitos no ciclo celular, induziu danos no DNA (PRASAD; KATIYAR, 2015).

Estudo de Rodriguez et al. (2002) avaliou a resposta das linhagens celulares de melanoma B16F10 e SK-MEL-1 ao tratamento com seis diferentes flavonóides após 24 e 72 horas de exposição e relacionar a resposta à sua estrutura. Tangeretina e luteolina mostraram ligeira inibição nas concentrações mais elevadas (25 e 50 microM) após tratamento por 24 h em ambas linhagens celulares, porém com maior sensibilidade à B16F10 que SK-MEL-1. A linhagem B16F10 foi mais sensível aos tratamentos do que a linha SK-MEL-1, ambos com melfalano e flavonóides, demonstrando a maior resistência do SK-MEL-1 e menor resistência do B16F10 são características de cada linha celular; esses

atributos podem ser relacionadas às suas respectivas origens cultura tumoral e melanoma metastático humano.

A tabela 12 apresenta valores de IC₅₀ após tratamento de células com frações e extrato purificado da maçã cv. Gala por 72 horas. Todos os valores de IC₅₀ foram elevados e superiores a outros estudos.

Tabela 12. Valores de IC₅₀ (µM) após tratamento de células com frações e extrato purificado da maçã cv. Gala por 72 horas.

Células	IC ₅₀ (72 horas) µM				Extrato purificado
	Frações				
	I	II	III	IV	
Melanoma humano SK-MEL-103	1637,04	1214,98	1502,27	1029,30	1007,10
Fibroblasto humano MRC55	13645,13	1413,18	2221,80	1301,12	1616,50
Melanoma murino B16F10	1779,04	481,72	652,90	485,34	495,02

Estudos mostraram uma correlação inversa entre o consumo de maçã e o risco de vários tipos de câncer, como câncer de próstata, mama, pulmão, colo-retal, esofágico, cavidade oral, pâncreas, bexiga, laringe, ovário, rim e cérebro (REAGAN-SHAW et al., 2010; FABIANI et al., 2016). Outros autores evidenciam a eficácia potencial dos compostos fenólicos na prevenção ou atenuação dos sintomas do distúrbio da pele e a redução do tempo de cicatrização (ABDUL KARIM et al., 2014; WITTENAUER et al., 2015), incluindo a prevenção e tratamento do câncer de pele (DZIAŁO et al., 2016).

Desde os tempos antigos já são feitas alterações nos alimentos que promovem melhora na biodisponibilidade de compostos fenólicos, como exemplo a fermentação de chás, grãos de cacau e uvas, ou torrefação de cacau e grãos de café tem sido usada há muito tempo e pode influenciar maciçamente a composição do polifenol e a potencial bioatividade.

Em estudo populacional com holandeses entre 1 e 97 anos foi investigado, por inquérito alimentar, que o consumo médio diário de catequina era de 50 mg e este consumo aumentou com a idade, e foi maior em mulheres (60 mg = dia). O chá era a principal fonte

de catequinas em todas as idades, enquanto o chocolate foi o segundo em crianças, e maçãs e peras foram o segundo em adultos e idosos (ARTS et al., 2001). Já em brasileiros, a estimativa de consumo médio foi de 460 mg/dia de compostos fenólicos totais, provenientes principalmente das bebidas (48,9%), como café, e de leguminosas (19,5%), especialmente feijão preto. A análise do consumo por classes de fenólicos possibilitou observar uma ingestão de 314 mg/dia de ácidos fenólicos, 138,92 mg/dia de flavonoides e 7,16 mg/dia de outros fenólicos (CORREA et al., 2015).

A maneira mais simples de reformular para obter produtos enriquecidos com polifenóis pode ser adicionar sucos de frutas aos sucos básicos, como sucos de laranja e maçã (MCDOUGALL, 2017). No entanto, ainda existem lacunas para o conhecimento de recomendação diária de ingestão de polifenóis para obtenção dos benefícios à saúde e como poderiam servir estes compostos como enriquecimento de alimentos (WILLIAMSON; HOLST, 2008). E, uma vantagem das frações de frutas transformadas em fitoterápicos ou suplementos é sua baixa toxicidade *in vivo* devido à baixa concentração relativa de moléculas com atividade citotóxica.

Existe uma ingestão esperada de polifenóis de 500 mg ao dia para indivíduo que consome 5 alimentos ricos em pelo menos uma das classe de polifenóis (flavononas, flavonol, flavanol, procianidina e antocianina) com base em dados derivados do banco de dados USDA (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2019) mas, os alimentos processados podem conter quantidades diferentes. Assim, uso de alimentos para enriquecimentos com frações e extratos de maçãs precisaria garantir que sua estabilidade durante a industrialização (WILLIAMSON; HOLST, 2008).

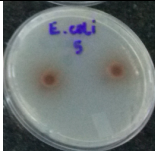
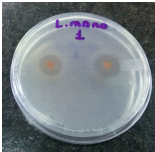
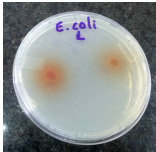
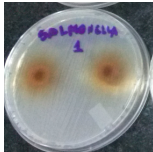
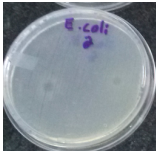
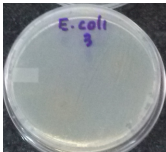
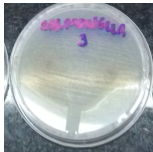
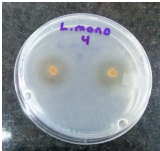
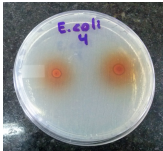
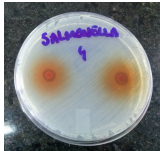
6.3.2 Efeitos dos compostos contra à microrganismos

O extrato fenólico purificado e as frações foram concentrados através da SPE, o que minimiza o risco de degradação fenólica. Neste método simples, eficaz e versátil, os componentes de interesse são concentrados e separados em famílias, aplicando a mistura da amostra a um sorvente sólido apropriado e eluindo seletivamente os componentes desejados (MICHALKIEWICZ et al., 2008). Isso reduz o uso de solventes e permite uma separação mais eficaz dos compostos. Entretanto, estudos demonstrando a atividade antimicrobiana de extratos fenólicos de *Malus domestica*, concentrados por extração em fase sólida, são pouco explorados na literatura. Cabe dizer que, extratos que produzem

halos de inibição variando de 8 a 13 mm são considerados moderadamente inibitórios, enquanto halos acima de 14 mm são considerados altamente inibitórios (MOTHANA; LINDEQUIST, 2005).

Os resultados da ação do extrato purificado e das frações contra bactérias patogênicas com base nas zonas de inibição constam na tabela 15. As bactérias gram-positivas foram mais sensíveis que as bactérias gram-negativas, exceto com fração III, para as quais as zonas de inibição foram significativamente maiores com *S. Typhimurium*, *E. coli*. A *L. monocytogenes* foi suscetível ao purificado e a todos as frações (exceto fração III), resultando em zonas de inibição com diâmetros variando de 3,75 mm a 14,68 mm. *S. aureus* foi suscetível a fração II e a IV. De acordo com a classificação previamente definida para extratos ativos e não ativos, a fração IV exibiu atividade antibacteriana contra *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium*. Fração IV e extrato purificado também mostraram atividade contra *L. monocytogenes* e *S. aureus*. Extratos contendo compostos fenólicos, como procianidina, rutina, quercetina e 2-O-glicosídeo de floretina, demonstraram atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas (CABRAL et al., 2009). Extratos que produzem halos de inibição variando de 8 a 13 mm são considerados moderadamente inibitórios, enquanto halos acima de 14 mm são considerados altamente inibitórios (MOTHANA; LINDEQUIST, 2005). A figura 26 demonstra os halos de inibição das frações e extratos.

Figura 26. Imagens das zonas de inibição após tratamento de culturas de bactérias patogênicas com extrato e frações fenólicas de maçã cv. gala.

Tratamento	Gram-positivo		Gram-negativo	
	L.	S.	E.	S.
	<i>monocytogenes</i>	<i>aureus</i>	<i>coli</i>	Typhimurium
Extrato purificado				
Fração I				
Fração II				
Fração III				
Fração IV				

Os flavonóides, compostos que estão presentes na totalidade do extrato purificado e das frações testadas, contêm um esqueleto fenilbenzopirano (dois anéis fenólicos e um anel pirano heterocíclico) e eles podem diferir no anel pirano e no padrão de hidroxilação e metilação dos anéis (LA ROSA et al., 2018). Esta configuração e, especialmente o grupo hidroxilo apresenta afinidade para as proteínas e, por essa razão, atuam como inibidores de enzimas bacterianas, assim como interferem nas suas vias de síntese (MUKNE; VISWANATHAN; PHADATARE, 2011).

As bactérias gram-negativas são notavelmente mais resistentes contra agentes antimicrobianos do que as gram-positivas. Isso se justifica pela complexidade da parede celular com a presença de uma barreira lipídica, o que dificulta a entrada e a ação de muitos

agentes antimicrobianos. No presente estudo apenas frações I e III tiveram atividade antimicrobiana frente aos gram-negativos, com baixo halo de inibição. A Fração I contendo ácidos fenólicos, moléculas de baixo peso molecular, talvez consigam ultrapassar esta barreira e ter ação contra os agentes.

Há um grande número de compostos fenólicos, com diferentes níveis de complexidade, todos suscetíveis às condições de extração e, portanto, sua presença no extrato final está ligada à metodologia de extração adotada, assim como o tipo de solvente utilizado (OLIVEIRA et al., 2018). Os flavonóides são conhecidos por serem sintetizados pelas plantas em resposta à infecção microbiana e esta ação antimicrobiana foi demonstrada *in vitro* (KUMAR; PANDEY, 2013). A atividade antibacteriana atribuída aos flavonóides, presentes em todas as frações e extrato, depende das estruturas química destes compostos, nomeadamente das substituições nos anéis aromáticos (XIE et al., 2015).

Os flavonóides têm maior capacidade de ser agente antibacteriano, especialmente, aqueles com substituintes hidrofóbicos como os grupos fenil (XIE et al., 2015). Por exemplo, quando o grupo fenil de uma flavona reage com o grupo adjetivo hidroxila para formar um heterociclo de seis membros pode diminuir sua atividade (SOHN et al., 2004). Diversos estudos verificaram a importância do grau de prenilação (adição de moléculas hidrófobas formando uma âncora) de flavonas para a atividade antibacteriana, por exemplo, o grupo prenil substituído, às vezes, reage com o grupo adjetivo hidroxila para formar um heterociclo de seis membros, o que, provavelmente, diminui a atividade (XIE et al., 2015). A substituição por nitrogênio das cadeias cíclicas ou alifáticas contendo nitrogênio aumentam as atividades antibacterianas (XIE et al., 2015). No presente estudo, as flavonas que estão presentes nas frações e no extrato purificado que tiveram atividade antibacteriana contêm pelo menos um de seus radicais hidroxilas.

Por exemplo, o galato de epigallocatequina e galato de epicatequina são as catequinas mais potentes que mostram atividade antibacteriana devido à presença de radical galoil, não presente em outras catequinas (BANSAL et al., 2013). Parece que estes dois compostos podem se ligar diretamente ao peptidoglicano da parede celular da bactéria e induzir sua precipitação, especialmente *Staphylococcus aureus*, ou gerar peróxido de hidrogênio pela reação deles com espécies reativas de oxigênio (BANSAL et al., 2013).

Já as flavononas têm a ligação C3-C4 saturada do anel C que torna o esqueleto nuclear da flavanona não planar e se tiver um substituinte pernil também melhora a atividade antibacteriana (XIE et al., 2015).

O flavonol tem um grupo hidroxila adicional à flavona na posição C-3, e quando o duplo C3-C4 está saturado, ele se transforma em di-hidroflavonol. Por exemplo, estudo investigou efeito da quercetina na microbiota cecal de frangos de corte *in vivo* e o efeito bacteriostático e mecanismo antibacteriano *in vitro*. Este flavonol foi efetivo contra multiplicação de *S. enterica* ser. Typhimurium, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* *in vivo* e *in vitro* o efeito bacteriostático da quercetina foi mais forte nas bactérias gram-positivas do que nas bactérias gram-negativas. Quercetina danificou as paredes celulares e membranas de *E. coli* e *S. aureus* (WANG et al., 2018).

As frações III e IV e extrato purificado apresentaram procianidinas em sua composição, no entanto somente a IV e o purificado apresentaram ação para bactérias gram-positivas. Em geral, a atividade antibacteriana das procianidinas poliméricas é apenas moderada em comparação com os antibióticos, mas seu verdadeiro mérito seria diminuir a estabilidade da membrana celular bacteriana (KUSUDA et al., 2006).

Na revisão de Xie et al. (2015), os autores reuniram informações de que há três mecanismos de inibição bacteriana pelos flavonóides, presentes em todas frações e extrato deste estudo, a saber: a inibição da síntese de ácidos nucleicos, a inibição da função da membrana citoplasmática e a inibição do metabolismo energético.

Karioti et al. (2011) verificaram que procianidinas de folhas de *Quercus ilex* era um agente antibacteriano eficaz contra bactérias gram-negativas e positivas. Estudo realizado com extratos de pele de jabuticaba verificou atividade inibitória contra *L. monocytogenes* e *S. aureus* para extratos de acetona na concentração de 125 µg mL⁻¹ onde continham ácido ferúlico, ácido gálico, cianidinas, catquequinas e epicatequinas (OLIVEIRA et al., 2018).

As concentrações inibitórias mínimas (CIM) contra bactérias patogênicas são mostradas na Tabela 15. Considera-se que um extrato tem uma atividade forte quando o valor de CIM é menor ou igual a 0,5 mg · mL⁻¹. Considera-se que um extrato com CIM entre 0,6 mg · mL⁻¹ e 1,5 mg · mL⁻¹ tenha atividade moderada e um extrato com CIM > 1,6 mg · mL⁻¹ seja considerado de baixa atividade (CABRAL et al., 2009). Considerando esta classificação, todas as frações e extrato purificado têm forte atividade contra *S. aureus* e *S. Typhimurium*. Contra *E. coli* e *L. monocytogenes*, quase todas as frações, exceto a IV,

tiveram fortes atividades. O extrato purificado apresentou forte atividade contra *S. aureus*, *E. coli* e *S. Typhimurium*, mas não contra *L. monocytogenes*.

A CIM é a menor concentração de um agente necessária para impedir o crescimento visível de bactérias. Todas as frações e o extrato purificado exibiram atividade inibitória, mas não promoveram a morte bacteriana. Apesar de sua forte atividade antimicrobiana evidenciada pela sua baixa CIM, nem extrato nem as frações promoveram a morte celular bacteriana, conforme determinado pelo CBM. Esse resultado pode ser atribuído às baixas concentrações de extrato usadas neste estudo.

Tabela 13. Zonas de inibição (mm) obtidas pelo método de difusão em disco após exposição de culturas de bactérias patogênicas à extratos fenólicos de maçã cv. gala.

Tratamento	Zona de inibição (mm)*			
	Gram-positivo		Gram-negativo	
	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>E. coli</i> ATCC 8739	<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028
Extrato purificado	14,68 ($\pm 0,26$) ^{Ba}	17,68 ($\pm 0,09$) ^{Aa}	nd	nd
Fração I	3,75 ($\pm 0,89$) ^{Ac}	nd	nd	4,59 ($\pm 0,34$) ^{Ab}
Fração II	6,13 ($\pm 0,07$) ^{Bb}	10,93 ($\pm 0,16$) ^{Ac}	nd	nd
Fração III	nd	nd	7,5($\pm 0,6$) ^{Aa}	7,0($\pm 0,0$) ^{Aa}
Fração IV	14,65 ($\pm 0,33$) ^{Ba}	16,19 ($\pm 0,05$) ^{Ab}	nd	nd

* Valores correspondem às médias (n = 3) $\pm$ desvios-padrão; nd: não detectado. Médias seguidas das mesmas letras, letras minúsculas na coluna ou letras maiúsculas na linha, não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Tabela 14. Concentração bactericida mínima (CBM) de extratos fenólicos de maçã cv.gala contra bactérias patogênicas.

Microrganismos	CBM				
	Frações				Extrato Purificado
	I	II	III	IV	
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i> ATCC 8739	+	+	+	+	+
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	+	+	+	+	+
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	+	+	+	+	+

*concentração inibitória mínima; - inibição da morte de microorganismos; + morte de microorganismos.

Extratos ricos em fenólicos da maçã podem servir como agentes antimicrobianos contra a deterioração de alimentos por patógenos. Extratos ricos em fenólicos de maçã foram testados contra *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *S. enterica* ser. Typhimurium e *Staphylococcus aureus*. Esses patógenos estão entre os agentes mais importantes de doenças transmitidas por alimentos em humanos e animais. As doenças transmitidas por alimentos afetam as condições de saúde da população, portanto, sua detecção e controle constituem componentes significativos do manejo global dos patógenos bacterianos de origem alimentar (BILLINGTON; HUDSON, 2014). A condição mais comum é a intoxicação alimentar bacteriana, causada por *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Clostridium perfringens*, *E. coli* ou *Bacillus cereus*, com sintomas comuns de gastroenterite, febre e fraqueza (ADLEY; RYAN, 2016).

Estudos mostram que compostos fenólicos, incluindo flavonóides (PANCHE et al., 2016), ácidos fenólicos e polifenóis (ALBERTO et al., 2006), possuem propriedades antimicrobianas, porém, todos realizados com extratos não purificados e/ou não fracionados, e/ou identificação de compostos ausentes, dificultando a interpretação dos resultados. Extratos hidrometanólicos de maçãs cv. Bravo de esmolfe apresentou contra gram-positivas, CIM de 2,5 mg / ml, para *Staphylococcus aureus* e de 5 mg / ml contra *Listeria monocytogenes*, já para as gram-negativa, o CIM foi de 5 mg / ml contra *Escherichia coli* (PIRES et al., 2018).

Na análise de atividade antimicrobiológica, contra *L. monocytogenes*, todos os tratamentos, exceto fração III, mostraram atividade antibacteriana, com zonas de inibição variando de 3,75 mm a 14,68 mm. Contra *S. aureus*, todos os tratamentos, exceto fração I e fração III, mostraram atividade antibacteriana, com zonas de inibição variando de 10,93 mm a 17,85 mm. A fração IV, que causou grandes zonas de inibição contra *L. monocytogenes* e *S. aureus*, apresentou alta atividade antioxidante (1226,8 µg mg⁻¹ de fração) e alto conteúdo fenólico (620,6 µg mg⁻¹ de fração). O extrato purificado, que foi mais efetivo contra bactérias gram-positivas, também apresentou alta atividade antioxidante (814,2 µg mg⁻¹ de fração) e alto conteúdo fenólico (390,8 µg mg⁻¹ de fração).

A presença e o tamanho dos halos de inibição indicam a suscetibilidade das bactérias aos extratos fenólicos. Halos menores que 7 mm indicam um extrato não ativo e aqueles maiores que 12 mm indicam um extrato com atividade antimicrobiana satisfatória (SOURABH et al., 2013). Pode-se inferir que o conteúdo fenólico dos extratos está diretamente relacionado ao seu potencial antimicrobiano. Entretanto, é importante ressaltar que os resultados da zona de inibição não devem ser simplesmente comparados, uma vez que algumas variáveis como o tipo de extrato e o meio de crescimento não estão diretamente relacionados ao potencial antimicrobiano (DUARTE et al., 2005).

Todos os tratamentos apresentaram atividade antibacteriana, com destaque para bactérias gram-positivas. As zonas de inibição foram significativamente maiores para *S. aureus* do que para *L. monocytogenes*. Extratos de maçãs “Granny Smith” com alto conteúdo fenólico demonstraram possuir alta atividade antibacteriana contra *E. coli*, *S. aureus* e *L. monocytogenes* (ALBERTO et al., 2006). No presente estudo, as cepas bacterianas gram-positivas testadas foram mais sensíveis aos extratos fenólicos, o que difere de outros estudos, nos quais as bactérias gram-negativas produziram halos de inibição maiores (ZHANG et al., 2016).

Bactérias gram-positivas e gram-negativas tem importante diferença na sua estrutura celular e isto interfere diretamente na barreira contra fatores externos, como exemplo ao ataque de extratos fenólicos. As bactérias gram-negativas possuem membrana externa que protege o microorganismo contra agentes externos e assim a malha de peptidoglicano ao redor delas é relativamente fina. Já as gram-positivas não possuem uma membrana externa protetora, mas são envolvidos por camadas de peptidoglicano bem espessas (SILHAVY; KAHNE; WALKER, 2010).

Não foram encontrados estudos demonstrando a atividade antimicrobiana de extratos de maçãs concentrados através de SPE. Deve-se notar que a composição da fração III é similar àquelas da fração IV e do extrato purificado, com quantidades muito altas de fenólicos. Compostos fenólicos de importância nutracêutica, como catequinas, epicatequina, epigallocatequina e epigallocatequina-3-galato, têm sido descritos como potentes agentes antimicrobianos (SOURABH et al., 2013).

Em um estudo semelhante, Shahbazi (2017) não observou halos de inibição após a incorporação de extratos metanólicos de maçãs (*Malus pumila*) em meios de cultura inoculados com *E. coli*, *S. aureus*, *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes*. Em um estudo realizado por Tahera et al. (2014) extratos aquosos de polpa de maçãs de Bangladesh promoveram a formação de halos de inibição com diâmetros de 9 mm (para *Escherichia* spp.), 9,5 mm - 10 mm (para *Staphylococcus* spp.), 9,7 10 mm (para *Listeria* spp.), e 7,8 - 11 mm (para *Salmonella* spp.). No presente estudo, o extrato purificado e as frações promoveram a formação de halos de inibição com diâmetros de 7,5 mm (para *E. coli*), 10,93-17,68 mm (para *S. aureus*), 3,75-14,68 mm (para *L. monocytogenes*) e 4,59 7,0 mm. (para *S. Typhimurium*).

Extratos de acetato de etila do bagaço de maçã *Golden Delicious* apresentaram boas atividades inibitórias contra *S. aureus* com uma concentração mínima de inibição (CIM) de 1,25 mg · mL⁻¹ e contra *E. coli* com uma CIM de 2,50 mg mL⁻¹ (ZHANG et al., 2016). Em nosso estudo, frações e purificado apresentaram boas CIM contra todas as cepas bacterianas, exceto fração IV contra *E. coli* e fração III contra *L. monocytogenes*. Pires et al. (2018) mostraram que os extratos hidrometanólicos de *Malus domestica* Borkh apresentou valores elevados de CIM para *E. coli* e *L. monocytogenes* (5 mg · mL⁻¹), indicando um nível considerável de atividade antimicrobiana. Da mesma forma, Shahbazi (2017) obteve valores de CIM superiores a 10 mg · mL⁻¹ para extratos metanólicos de *Malus pumila* contra *E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium*.

Frações etanólicas ricas em fenólicos extraídas e fracionadas a partir da casca de bergamota mostraram-se ativas contra todas as bactérias gram-negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, *S. enterica* ser. Typhimurium) e gram-positivas (*Listeria innocua*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Lactococcus lactis*). Os valores de CIM da fração rica em flavonóide (70 E1) apresentou CIM de 0,4 mg·mL⁻¹ para *E. Coli* e 0,8 mg·mL⁻¹ para *S. Typhimurium*. Sendo que a *E. coli* foi a cepa mais sensível (inibição completa atingida

com uma concentração de 0,2 mg·mL⁻¹), seguida por *S. Typhimurium* (0,4 mg·mL⁻¹). Neste mesmo estudo o eriodictol foi testado individualmente, apresentando CIM de 0,3 (mg·mL⁻¹) para *E. coli*, 0,8 (mg·mL⁻¹) para *S. Typhimurium* e *S. aureus* (MANDALARI et al., 2007).

Tabela 15. Concentração inibitória mínima (CIM) de extratos fenólicos de maçã cv. gala contra bactérias patogênicas.

Microrganismos	Concentração (mg·mL ⁻¹)*				
	Frações				Extrato purificado
	I	II	III	IV	
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
<i>E. coli</i> ATCC 8739	0,5	0,5	0,05	nd	0,05
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	0,5	0,05	nd	50	50
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	0,05	0,05	0,05	0,05	0,5

*n=4; nd: Não detectado

Considerou-se como uma boa atividade antimicrobiana quando a CIM era inferior a 0,1 mg / ml; de 0,1 a 0,5 mg / ml, a atividade antimicrobiana foi moderada; de 0,5 a 1 mg / ml, a atividade antimicrobiana era fraca e acima de deste valor de CIM o extrato foi considerado inativo (HOLETZ et al., 2002). No caso do estudo em questão, as frações tiveram atividades boas ou moderadas.

De acordo com os resultados de CIM, todas as cepas bacterianas testadas em nosso estudo foram sensíveis a um ou mais tratamentos; no entanto, isso ocorreu sem morte celular bacteriana, conforme determinado pelo CBM. Filmes comestíveis de maçã enriquecidos com polifenóis de casca de maçã foram altamente eficazes contra *L. monocytogenes* (DU et al., 2011). Estudos demonstraram que extratos fenólicos de cascas de maçã das variedades "Royal Gala" e "Granny Smith" inibem o crescimento de *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *S. aureus* em alto grau (YAMAGUCHI et al., 2008). Outro estudo demonstrou a atividade antimicrobiana efetiva de extratos de casca de maçã contra *L. monocytogenes* e *S. aureus* (FRIEDMAN; HENIKA; LEVIN, 2013). Fratianni et al. (2011) também mostraram que o mecanismo subjacente à atividade antimicrobiana dos extratos de maçã "Annurca" pode ser baseado na regulação do crescimento celular ou na inibição da detecção do quorum (sinalização célula-célula).

S. aureus e *L. monocytogenes* foram mais sensíveis aos tratamentos. Esses agentes causam doenças transmitidas por alimentos, que são um grande problema na saúde pública, sendo responsáveis por doenças de gravidade variável e morte em todo o mundo, causando um enorme impacto social e econômico sobre as comunidades e seus sistemas de saúde. O *S. aureus* causa infecções graves e pode levar à intoxicação alimentar, liberando enterotoxinas nos alimentos e a síndrome do choque tóxico, liberando superantígenos na corrente sanguínea. É também uma das principais causas de infecção hospitalar, estando associada a maiores taxas de mortalidade e maior permanência hospitalar (DE KRAKER et al., 2011). A *L. monocytogenes*, geralmente transmitida por produtos lácteos, causa febre, fadiga, mal-estar e pode ou não causar náusea, vômito, dor e diarreia. Meningite, meningoencefalite, encefalite e septicemia podem ocorrer em casos mais graves (FRIEDMAN; HENIKA; LEVIN, 2013).

Todos os extratos de maçã apresentaram alto teor de compostos fenólicos, em particular fração IV. Outras frutas, como morangos, apresentam alto teor fenólico e estão associadas à inibição do crescimento microbiano (OLIVEIRA et al., 2016). Extratos metanólicos de uma maçã nativa iraniana cv. Gala, obtida por meio do SPE, possui alto conteúdo fenólico (FARAMARZI et al., 2014). Frações de extratos etanólicos de cascas de maçã contendo quercetina e glicosídeos de epicatequina, mostraram altas atividades antioxidantes quando combinadas com outros polifenóis, como fluoridina e cianidina-3-O-galactosídeo (SEKHON-LOODU et al., 2013). Constatou-se que o conteúdo fenólico total está positivamente correlacionado com a atividade de inibição bacteriana em quatro cultivares de macieira (QI et al., 2003). Entretanto, em nosso estudo, a atividade antibacteriana foi provavelmente mais fortemente influenciada pelos compostos fenólicos específicos encontrados no extrato do que a quantidade total de fenólicos presentes.

Outros estudos confirmam a atividade microbiana dos compostos fenólicos. Filmes de quitosana incorporados com várias concentrações de ácido gálico aumentaram a atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria innocua* e *Bacillus subtilis* (SUN et al., 2014). Os extratos da casca e do pericarpo de frutas do mangostão contêm misturas de compostos fenólicos e foram ativos contra bactérias gram-positivas, notadamente a *Listeria monocytogenes* (PALAKAWONG et al., 2013). Frutas ricos em fenol (2,12 mg de ácido gálico g⁻¹ a 30,63 mg de GAE g⁻¹), como *Crataegus oxyacantha* L. (Rosaceae), apresentaram potencial antifúngico e antimicrobiano contra *Escherichia coli*,

Pseudomona aeruginosa, *Salmonella ebony*, *Aspergillus niger* e *Candida albicans* (KOSTIC et al., 2012).

Os principais componentes dos polifenóis das folhas de batata-doce são os ácidos clorogênicos, que são as esterificações do ácido cafeico e do ácido quínico. Estes podem ser hidrolisados em ácido cafeico e ácido quinico em condições ácidas e alcalinas. Há uma correlação positiva definitiva entre a atividade antioxidante e o número de cafeína na estrutura molecular dos ácidos clorogênicos (SUN; MU; XI, 2017).

Extratos metanólicos de 8 plantas medicinais tradicionais, ricas em conteúdos fenólicos e flavonóides, foram ativos contra bactérias gram-positivas (5 cepas) e Gram-negativas (10 cepas) com ação mais potente para as gram-negativas (*S. typhimurium* e *E. coli*). Os mecanismos antibacterianos relatados podem ser inibir a síntese da parede celular dos microrganismos, se acumular em membranas bacterianas causando depleção de energia, interferir na permeabilidade da membrana celular que tem como consequência perda de constituintes celulares, ruptura da membrana e mudanças na estrutura e função dos principais constituintes celulares, resultando em mutação, dano celular e morte (KANG et al., 2011).

Extratos de cranberry inibiram o crescimento de ampla gama de bactérias patogênicas humanas, tanto gram-negativas (*Escherichia coli* e *S. enterica* ser. Typhimurium) e gram-positivas (*Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*) (ČESONIENĖ; JASUTIENĖ; ŠARKINAS, 2009).

Estudos revelam que além de atuar como agentes antimicrobianos os compostos fenólicos também tem interação potencial com a microbiota intestinal. Parece que eles promovem as bifidobactérias enquanto inibem as patogênicas (LEE et al., 2006). Cinco compostos fenólicos (catequina e ácidos gálico, vanílico, ferúlico e protocatecuico) permitiram seletivamente o crescimento de lactobacilos probióticos (*Lactobacillus rhamnosus* GG e *Lactobacillus acidophilus*) e inibiram bactérias patogênicas na mesma concentração (20 mmol l⁻¹). A CIM e o CBM dos ácidos fenólicos contra *E. coli* e *S. Typhimurium* apresentaram valores de 15 a 30 mmol l⁻¹, mas catequina precisava de uma maior concentração para atingir um efeito semelhante (> 35 mmol l⁻¹) (PACHECO-ORDAZ et al., 2018).

Por fim, os consumidores estão cada vez mais exigindo produtos alimentícios seguros, naturais, sem conservantes químicos e de alta qualidade e por isso a tendência

de usar antimicrobianos naturais está se tornando uma abordagem atraente no campo da preservação e segurança de alimentos, porque os antimicrobianos sintéticos podem estar associados a vários riscos à saúde (SADIQ et al., 2017). Isso se reflete no crescente interesse das indústrias alimentícias em encontrar produtos de alta qualidade com compostos naturais que exibem atividade antimicrobiana (MANDALARI et al., 2007).

6.3.3 Efeitos dos compostos na redução da glicemia

A capacidade de eliminação do radical DPPH variou de $0,03 \pm 0,0001$ a $8,7 \pm 0,154$ mg / mL (Tabela 16). Para o radical Hidroxila, os valores de IC₅₀ variaram de $8,93 \pm 0,27$ a $471,08 \pm 5,08$ mg / mL. O extrato purificado e as frações III e IV foram as mais eficientes no combate aos radicais livres testados, quando comparadas às demais frações, talvez porque estas frações fenólicas possuíam também maior poder sequestrante do radical DPPH e da hidroxila.

Acarbose, é um medicamento utilizado como redutor da glicemia, cujo mecanismo de ação é através da inibição de α -amilases e α -glicosidases (WILLIAMSON, 2013). Este foi utilizado como controle do experimento.

A inibição da α -glicosidase é importante devido ao potencial efeito da regulação negativa da absorção de glicose nos pacientes. O extrato purificado foi o mais forte inibidor da α -glicosidase (IC₅₀ 19 μ g / mL), seguido pelas frações IV e III, respectivamente (Tabela 16). Essas frações têm composição fenólica semelhante e também a maior concentração fenólica total (Figura 10). Todos os extratos foram capazes de inibir a α -glicosidase mais efetivamente do que o controle positivo acarbose (uma droga usada por pacientes com intolerância à glicose ou diabéticos) e quercetina (um potente antioxidante). Porém, nenhuma fração nem o extrato inibiram a α -amilase assim como outros autores (NYAMBE--SILAVWE; WILLIAMSON, 2018).

Tabela 16. Atividade antioxidante e inibição das enzimas α -glicosidase e α -amilase por extratos e frações de maçã cv. *Gala*.

Unidade experimental	α -Glicosidase IC ₅₀ (μ g/mL)	α -Amilase IC ₅₀ (μ g/mL)	DPPH* IC ₅₀ (mg/mL)
Extrato purificado	19,01 $\pm$ 1,02	Não atingiu	0,05 $\pm$ 0,0002
Fração I	Não atingiu	Não atingiu	8,7 $\pm$ 0,154
Fração II	Não atingiu	Não atingiu	3,7 $\pm$ 0,051
Fração III	67,01 $\pm$ 8,90	Não atingiu	0,03 $\pm$ 0,0001
Fração IV	32,12 $\pm$ 5,67	Não atingiu	0,04 $\pm$ 0,001
<i>Controls</i>			
Acarbose	840,00 $\pm$ 100,20	141,00 $\pm$ 18,00	---
Quercetin	661,00 $\pm$ 7,00	---	---

*Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão de três repetições

Assim, esses extratos de maçã podem ser uma opção para prevenir e tratar o diabetes. Acredita-se que o glucosil-O-pentosil-O-glicosídeo, florentina-2'-O-xilosil-glicosídeo e florentina-2'-O-glicosídeo sejam únicos para as maçãs e seus derivados, e eles desempenham um papel na inibição dependente do sódio transportador de glicose no lúmen intestinal. Especialmente o phlorentin-2'-O-xilosil-glicosídeo que reduz os níveis de glicose pós-prandial, ação que pode ser benéfica para o tratamento do diabetes mellitus (JOHNSTON; CLIFFORD; MORGAN, 2002; MARKS et al., 2009). Por exemplo, a florentina presente nas três unidades experimentais com poder inibitório, já foi identificada como redutora da hiperglicemia previamente, e em estudo feito por análise de rede, identificaram seu potencial envolvimento de interação e regulação potencialmente com a MAPK1 (proteína z. (RANDHAWA et al., 2013).

Framboesas (*Rubus idaeus*), por exemplo, ricas em ácido elágico, catequina, pelargonidina-3-rutinosídeo, diglucosídeo cianidina, também reduzem a ação da α -glicosidase (ZHANG et al., 2011). Schmidt et al. (2012) avaliaram a inibição de α -glicosidase de compostos presentes em casca de maçã. Os autores descobriram que o IC₅₀ da quercetina era 100 vezes mais potente que o da acarbose.

Os agentes hipoglicemiantes, como a acarbose e o miglitol, controlam a ação da α -glicosidase, podem ser encontrados na maioria dos hospitais e são comumente prescritos

para obesidade e diabetes (LIN et al., 2016). Eles têm a função retardar a digestão destes carboidratos, logo reduzindo o aumento pós-prandial da glicemia, porém, apresentam efeitos adversos como a dor e distensão abdominal, flatulência, fezes moles e diarreia.

A vantagem de usar inibidores de glicosidase é que não altera diretamente o metabolismo da insulina (GHOSH; KONISHI, 2007). Por exemplo, o uso de medicamentos à base de sulfoniluréia tendem a afetar adversamente a capacidade das células β de secretar níveis consistentes de insulina no organismo. Além disso, as antocianinas protegem as células β pancreáticas do estresse oxidativo induzido pela glucose (GHOSH; KONISHI, 2007). Estudos *in vitro* e *in vivo* com extratos de antocianina tem potente atividade inibitória da alfa-glucosidase, suprimindo o aumento do nível de glucose pós-prandial (MATSUI et al., 2001).

Os valores de IC_{50} obtidos para as frações de maçã em relação ao DPPH variaram de $0,03 \pm 0,0001$ mg / mL a $8,7 \pm 0,154$ mg / mL (Tabela 16). O extrato purificado e as frações III e IV foram os mais eficientes sequestradores de radicais, o que pode estar relacionado ao maior conteúdo de compostos fenólicos (Tabela 7). O radical hidroxila é um radical livre excessivamente nocivo, produzido em sistemas biológicos, capaz de danificar quase todas as moléculas encontradas nas células vivas (RAO; CHAUDHURY; PRADHAN, 2010). A reação de compostos fenólicos com radicais hidroxila é baseada em suas propriedades redutoras e sequestradoras de radicais livres. Por exemplo, Faramarzi et al. (2014) verificaram em maçãs iranianas nativas da cv. Gala DPPH de IC_{50} de 62% μ g de trolox por mg de fruta inteira. Já a cv. Anna, em estudo com maçãs da Costa Rica, apresentaram IC_{50} $6,64 \pm 0,12$ (μ g/mg) (NAVARRO et al., 2018). Extratos hidrometanólicos de maçãs cv. Bravo de esmolfe demonstraram valor de IC_{50} similares (0.71 mg/mL) (PIRES et al., 2018). Maçãs da Itália analisadas apresentaram com IC_{50} de 39,3% para Fuji, de 58,5% para Braeburn e 26,6% para Golden (CARBONE et al., 2011). Outro estudo com quatro cultivares de maçãs iranianas apresentaram moderada atividade antioxidante com no máximo 64 % percentuais de inibição do DPPH (JELODARIAN et al., 2012). Faramarzi et al. (2014) verificaram em maçãs iranianas nativas da cv. Gala IC_{50} de 62% de inibição do DPPH.

O estresse oxidativo ocorre devido a uma cascata de radicais livres que vazam da mitocôndria. Este processo tem sido associado com diabetes mellitus tipo 1 e tipo II, via apoptose de células β -pancreáticas e resistência à insulina, respectivamente. Além disso,

a deficiência de insulina promove a β -oxidação dos ácidos graxos, resultando em aumento dos valores de peróxido de hidrogênio. Em pacientes diabéticos, o aumento dos níveis de radicais livres danificará as células do pâncreas e do fígado. Recentes tratamentos diabéticos revelaram que os inibidores da α -glicosidase são importantes para a redução das condições hiperglicêmicas pós-prandiais (SARAVANAN; PARIMELAZHAGAN, 2014).

Estudo de Yan et al., (2014), a atividade inibitória da flavona luteolina na α -glicosidase e seu mecanismo de interação foram investigados. O flavonoide inibiu reversivelmente a α -glicosidase de forma não competitiva de uma maneira dependente da concentração e a inibição seguiu um processo cinético multifásico com uma reação de primeira ordem. Eles demonstraram que a ligação da luteolina à α -glicosidase induziu rearranjo e alterações conformacionais da enzima.

Alguns estudos relatam que diversos compostos polifenólicos, com as antocianinas as mais substanciadas, estão associados tanto à prevenção quanto ao controle do diabetes tipo 2, através da proteção das células beta do pâncreas frente à toxicidade da glicose, aos efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes, à desaceleração da digestão do amido e à regulação e transporte alterado de glicose, levando a um melhor controle glicêmico (XIAO; HOGGER, 2015; ZHANG et al., 2015).

Estudo onde indivíduos ingeriram 2,8g de extrato de maçã encapsulado (contendo phlorizina, floretina, quercetina, campferol, Kaempferol, isoramnetina e ácido clorogênico) reduziu a área incremental sob a curva para glicose venosa nos primeiros 45 minutos após tratamento, melhorou o teste oral de tolerância à glicose quando comparados aos indivíduos com tratamento controle e isso foi acompanhado por uma diminuição significativa de área incremental sob a curva para insulina plasmática dentro dos primeiros 90 minutos (SCHULZE et al., 2014).

Sugere-se que as frações e extratos com efeito inibitório na enzima α -glicosidase tenha ação sinérgica para este fim. Alguns compostos isolados já demonstraram efeito inibitório para esta enzima, como a antocianina cianidina 3-sambubioside e o flavonóide quercetina (IWAI et al., 2006; TADERA et al., 2006; LO PIPARO et al., 2008). Estudo de Akkarachiyasit et al. (2010) testou a atividade inibitória α -glicosidase da cianidina e de seus glicosídeos. Eles observaram que as atividades inibitórias da sacarase intestinal aumentaram na ordem de cianidina-3-galactosídeo > cianidina-3-glicosídeo > cianidina > cianidina-3,5-diglucosídeo.

Os ácidos fenólicos foram estudados por Malunga, Thandapilly e Ames (2018) na modulação da atividade da α -glucosidase intestinal com cinco derivados de ácido hidroxicinâmico, seis hidroxibenzóico e quatro conjugados de ácido hidroxicinâmico foram utilizados para investigar a relação de atividade estrutural e a cinética de inibição da enzima. Estes ácidos diferem no número ou posição do grupo hidroxila ou metoxi e alguns ácidos fenólicos são encontrados conjugados com outros compostos como o ácido quínico (ácido clorogênico). No estudo referido a presença do segundo grupo hidroxila ou adição de um grupo metoxi em um anel aromático aumentou a percentagem de inibição dos ácidos hidroxicinâmicos. As frações II, III e IV e extrato purificado contém ácidos hidroxicinâmicos, entre clorogênico, 4 p-coumaroilquínico e caféico, porém somente frações III, IV e purificado que apresentaram atividade inibitória para α -glucosidase. Uma explicação é que grupos hidroxila e metoxi estão fornecendo mais íons para competir com aqueles fornecidos pelo substrato para interagir com o enzima e este potencial dos ácidos hidroxicinâmicos aumenta na seguinte ordem p-cumárico > ferúlico > sinápico > ácido cafeico. O ácido gálico no referido estudo apresentou 38,5 % de percentual de inibição, porém, a fração I onde este composto está presente não atingiu potencial inibitório (MALUNGA; THANDAPILLY; AMES, 2018).

Por fim, outros efeitos, além da inibição da α -glicosidase, poderiam ser obtidos com o uso de fenólicos para redução de hiperglicemia. A homeostase da glicose acontece através de múltiplos mecanismos de ação potenciais dos compostos fenólicos no intestino (inibir a absorção de glicose pelo transportador de glicose dependente de sódio 1), no fígado (estimular a secreção de insulina e reduzir a produção de glicose hepática), nos adipócitos musculares (aumentar a captação de glicose dependente de insulina), nas células β pancreáticas (atividade antioxidante que inibem a formação de produtos finais de glicação avançada), bem como através de efeitos prebióticos na microbiota (KIM; KEOGH; CLIFTON, 2016).

7. CONCLUSÕES

Extratos fracionados e purificados da maçã gala (*Malus domestica* Borhk) possuem 32 compostos fenólicos identificados, entre as subclasses de ácidos hidrocínânicos, flavonona, flavonóis e dihidrochalcona. Frações III, IV e extrato purificado apresentaram compostos similares e elevada atividade antioxidante correlacionada ao conteúdo de fenólicos em cada uma. A estabilidade deles se manteve, especialmente entre os extratos na condição de armazenamento ótima.

O extrato purificado reduziu em até 34 % os danos ao material genético, ficando evidente seu efeito na redução da fragmentação do DNA induzida pela radiação ultravioleta em cultura de fibroblastos humanos. De forma semelhante, as frações II, III e IV reduziram os danos ao material genético em 19 %, 17 % e 22 %, respectivamente. Além disto a fração III (IC₅₀ 652,90µM) e IV (IC₅₀ 485,34µM) mostraram atividade anticâncer frente as células de melanoma B16F10.

A fração IV e o extrato purificado inibiram efetivamente o crescimento de bactérias gram-positivas (*Listeria monocytogenes* e *S. Aureus*).

Especialmente o extrato purificado inibiu a ação da enzima α-glicosidase (IC₅₀ 19 µg / mL).

O extrato purificado e as frações fenólicas de maçã cv. gala apresentam potencial para utilização como protetores da pele contra o fotoenvelhecimento e câncer, como inibidores de glicosidases e de bactérias patogênicas em alimentos, sendo sua utilização promissora na indústria alimentícia e farmacêutica, especialmente as frações III, IV e o extrato purificado.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

O aparente sinergismo entre compostos presentes nas frações III e IV e no extrato purificado permanece para ser verificado e caracterizado, bem como permanece para ser determinada a concentração de cada componente no extrato purificado e nas frações.

A biodisponibilidade dos componentes bioativos presentes no extrato purificado e nas frações precisa ser avaliada em matrizes alimentícias. Também precisa ser avaliada a performance destes componentes bioativos no uso tópico, como medicamento ou cosmético. Neste contexto, a encapsulação dos componentes bioativos constitui alternativa para modular a sua liberação no espaço e no tempo e para assegurar a estabilidade dos mesmos.

Considerando as propriedades já constatadas do extrato purificado e das frações fenólicas de maçã, vislumbra-se que a maçã, além do consumo *in natura*, possa ser utilizada como matéria prima para extração de compostos bioativos para subsequente utilização em alimentos funcionais, em medicamentos e cosméticos.

REFERÊNCIAS

- ABDUL KARIM, A.; AZLAN, A.; ISMAIL, A.; HASHIM, P.; ABD GANI, S. S.; ZAINUDIN, B. W.; ABDULLAH, N. A. Phenolic composition, antioxidant, anti-wrinkles and tyrosinase inhibitory activities of cocoa pod extract. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. v.14, n. 1, p. 381, 2014.
- ABPM. **Associação Nacional dos Produtores de Maçã**. Disponível em: <<http://fração.abpm.org.br/>>. Acesso em: 25 fevereiro 2019.
- ALBAYRAK, S., AKSOY, A., SAGDIC, O., HAMZAOGLU, E. Compositions, antioxidant and antimicrobial activities of Helichrysum (Asteraceae) species collected from Turkey. **Food Chemistry**, n.19, p.114-122. 2010.
- ALBERTI, A. et al. Optimisation of the extraction of phenolic compounds from apples using response surface methodology. **Food Chemistry**, v.149, p. 151–158, 2014.
- ALBERTI, A.; ZIELINSKI, A.A.F.; COUTO, M.; JUDACEWSKI, P.; MAFRA, L.I.; NOGUEIRA, A. Distribution of phenolic compounds and antioxidant capacity in apples tissues during ripening. **Journal Food Science Technology**, v.54, n. 6, p. 1511–1518, mai 2017.
- ALMEIDA, M. M. B.; DE SOUSA, P. H. M.; ARRIAGA, Â. M. C.; DO PRADO, G. M., MAGALHÃES, C. E. DE C.; MAIA, G. A.; DE LEMOS, T. L. G. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. **Food Research International**, v.44, n.7, p. 2155–2159, 2011.
- ALVES, T.M.A., SILVA, A.F., BRANDÃO, M., GRAND, T.S.M., SMÂNIA, E.F.A., JUNIOR, A.S., ZANI, C.L. **Biological screening of brazilian medicinal plants**. Mem. Instituto Oswaldo Cruz. n.95, p.367–373, 2000.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, **Standards of medical care in diabetes**, Diabetes Care, v. 28, p. S4eS36, 2005.
- APREA, E.; CHARLES, M.; ENDRIZZI, I.; COROLLARO, M.L.; BETTA, E.; BIASIOLI, F.; GASPERI, F. Sweet taste in apple: the role of sorbitol, individual sugars, organic acids and volatile compounds. **Scientific Reports - Nature**. v. 7, p. 44950, 2017.
- ARTS, I.; HOLLMAN, P.; FESKENS, E.; MESQUITA, B.H.; KROMHOUT, D. Catechin intake and associated dietary and lifestyle factors in a representative sample of Dutch men and women. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.55, n.2, p. 76–81, 2001.
- ASENSI, M.; ORTEGA, A.; MENA, S.; FEDDI, F.; Estrela, J.M. Natural polyphenols in cancer therapy. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 48, p. 197–216, 2011.

- AWAD, M.; JAGER, A.; VAN DER PLAS, L.; VAN DER KROL, A. Flavonoid and chlorogenic acid changes in skin of Elstar and Jonagold apples during development and ripening. **Scientia Horticulturae**, v. 90, p. 69-83, 2001.
- BABBAR, N.; OBEROI, H. S.; SANDHU, S. K. Therapeutic and nutraceutical potential of bioactive compounds extracted from fruit residue. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.55, n.3, p 319-337, 2015.
- BAGAMBOULA, C.F., UYTENDAELE, M., DEBEVERE, J., 2003. Antimicrobial Effect of Spices and Herbs on *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. **Journal of Food Protection**. v. 66, p. 668-673.
- BAGETTI, M. et al . Antioxidant capacity and composition of pitanga seeds. **Ciência Rural**, Santa Maria , v. 39, n. 8, p. 2504-2510, Nov. 2009
- BAI, X.; ZHANG, H.; REN, S. Antioxidant activity and HPLC analysis of polyphenol-enriched extracts from industrial apple pomace. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.93, n.10, p.2502–2506, 2013.
- BANSAL, S.; CHOUDHARY, S.; SHARMA, M.; KUMAR, S.S.; LOHAN, S.; BHARDW, V.; SYAN, N.; JYOTI, N. Tea: A native source of antimicrobial agentes. **Food Research International**, v. 53, n. 2, p. 568-584, Out 2013.
- BENNO, B.K. et al. Anuário brasileiro da maçã 2018. **Associação Brasileira dos Produtores de Maçã**. Santa Cruz do Sul : Editora Gazeta Santa Cruz, 2018. 56p.
- BERWICK M, BULLER D, CUST A, GALLAGHER R, LEE TK, MEYSKENS F, PANDEY S, THOMAS NE, VEIERØD MB. Melanoma epidemiology and prevention. **Cancer Treatament Research**, v.167, p.17-49, 2016.
- BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.12, n.2, p. 123-30, 1999.
- BOUDERBALA, H.; KADDOURI, H., KHEROUA, O.; SAIDI, D. Anti-obesogenic effect of apple cider vinegar in rats subjected to a high fat diet. **Annales de Cardiologie et d'Angéiologie (Paris)**. v. 65, n.3, p.208-13, 2016.
- BOYER, J; LIU, R.H. Apple phytochemicals and their health benefits. **Nutrition journal**, v.3, n.5, 2004.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel Wissenschaft and Technologies**, v.1. n. 28, p. 25-30, 1995.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Projeções do Agronegócio: Brasil 2012/2013 a 2022/2023** / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Assessoria de Gestão Estratégica. – Brasília: Mapa/ACS, 2013. 96 p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância [Internet]. **Estimativa 2016: incidência de câncer**

no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2017 [citado 2017 jun 20]. Disponível em: <
<http://fração.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf>>

CARDOSO, A.; LEMOS, L.; FRIGHETTO, M.; ESTELA NUNES, E. Total Phenolics Extracted from the Skin of Fuji Apple and Total phenolics extracted from the skin of fuji apple and incorporated by Liposome in Galenic Bases: an Alternative to Use By- Products of Food Industry. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 16, n.6, 2011 .

CASAGRANDE, R. ; GEORGETTI, S.R.; VERRI JR., H.A.; DORTA, D.J. SANTOS, A.C. DOS ; FONSECA, M.J. Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice, **Journal Photochemical Photobiologic**. v. 84, p. 21-7, 2006.

ČESONIENĖ, L.; JASUTIENĖ, I.; ŠARKINAS, A. Phenolics and anthocyanins in berries of European cranberry and their antimicrobial activity. **Medicina**, v.45, n.12, p. 992, 2009.

CEYMAN, M.; ARRIGONI, E.; SCHÄRER, H.; BOZZI NISING, A.; HURRELL, R. F. Identification of apples rich in health-promoting flavan-3-ols and phenolic acids by measuring the polyphenol profile. **Journal of Food Composition and Analysis**. v.26, p. 1–2 128-135, 2012.

CHEN, H.; QU, Z.; FU, L.; DONG, P.; ZHANG, X. Physicochemical properties and antioxidant capacity of 3 polysaccharides from green tea, oolong tea, and black tea. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 6, p. 469-474, 2009.

CHENG, H., XU, Q., LIU, J., ZHAO, C., XUE, F., ZHAO, H.. Decomposition of five phenolic compounds in high temperature water. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v.25, p. 2102-2107, 2014.

CHINEMBIRI, T.N.; DU PLESSIS, L.H.; GERBER, M.; HAMMAN, J.H.; DU PLESSIS, J. Review of Natural Compounds for Potential Pele Cancer Treatment. **Molecules**. v.19, p.11679-11721, 2014.

CINKILIC, N. et al. Radioprotection by two phenolic compounds: Chlorogenic and quinic acid, on X-ray induced DNA damage in human blood lymphocytes in vitro. **Food and Chemical Toxicology**, v.53, p.359–363, 2013.

CORREA, V.G.; TURECK, C.; LOCATELI, G.; PERALTA, R.M.; KOEHNLEIN, E.A. Estimate of consumption of phenolic compounds by Brazilian population. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 28, n. 2, p. 185-196, Apr. 2015.

D'ARCHIVIO et al. Polyphenols, dietary sources, and bioavailability. **Annali dell'Istituto Superiore Di Sanita**, Roma, v. 43, p.348-61, 2007.

D'ORAZIO, J.; JARRETT, S.; AMARO-ORTIZ, A.; SCOTT, T. UV Radiation and the Pele. **International Journal of Molecular Sciences**. v.14, n.6, p.12222-12248, 2013.

DAI, J.; MUMPER, R.J. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. **Molecules**. v.15, p.7313-7352, 2010.

- DAVID, D.J.V.; COSSART, P. Recent advances in understanding *Listeria monocytogenes* infection: the importance of subcellular and physiological context. **F1000 Research**, v.6, p.1126, 2017.
- DE MELO, A. C.; WAINSTEIN, A. J. A.; BUZAID, A. C.; THULER, L. C. S. Melanoma signature in Brazil. **Melanoma Research**, v. 28, n.6, p.629-636, 2018.
- DEVASAGAYAM, T.P.A., TILAK, J.C., BOLOOR, K.K., SANE, K.S., GHASKADBI, S.S., LELE, R.D. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. **Journal of Association of Physicians of India**, v.52, p. 794–804. 2004.
- DING, M.; LU, H.; BOWMAN, L.; HUANG, C.; LEONARD, S.; WANG, L.; VALLYATHAN, V.; CASTRANOVA, V.; SHI, X. Inhibition of AP-1 and Neoplastic Transformation by Fresh Apple Peel Extract. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 279, n. 11, p. 10670–10676, 2004.
- DRIGLA, F.; BALACESCU, O.; VISAN, S.; BISBOACA, S.E.; BERINDAN-NEAGOE, I.; MARGHITAS, L.A. Synergistic Effects Induced by Combined Treatments of Aqueous Extract of Propolis and Venom. **Clujul Medical**. v.89, n.1, p.104-109, 2016.
- DROGOUDI, P.D.; MICHAILIDIS, Z.; PANTELIDIS, G. Peel and flesh antioxidant content and harvest quality characteristics of seven apple cultivars. **Science Horticulture**. v.115, p. 149–153, 2008.
- DUKHI, N.; TAYLOR, M. A Focus on Four Popular “Functional Foods” as Part of a Strategy to Combat Metabolic Disease Through the Increased Consumption of Fruits and Vegetables. **Current Research in Nutrition and Food Science**. v. 06, n. 2 , p. 294-306, 2018.
- DZIAŁO, M., MIERZIAK, J., KORZUN, U., PREISNER, M., SZOPA, J., KULMA, A. The Potential of Plant Phenolics in Prevention and Therapy of Skin Disorders. **International Journal of Molecular Sciences**. v.17, n. 2, p. 160, 2016.
- ENSAFI, A.A.; HEYDARI-SOURESHJANI, E.; JAFARI-ASL, M.; REZAEI, B.; GHASEMI J.B.; AGHAEI, E. Experimental and theoretical investigation effect of flavonols antioxidants on DNA damage. **Analytica Chimica Acta**, v.887, p.82e91, 2015.
- ESPINO-DÍAZ, M.; SEPÚLVEDA, D.R.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G.; OLIVAS, G.I. Biochemistry of Apple Aroma: A Review. **Food Technology Biotechnology**. v.54, n4, p. 375–397, 2016.
- FABIANI, R.; MINELLI, L.; ROSIGNOLI, P. Apple intake and cancer risk: a systematic review and meta-analysis of observational studies. **Public Health Nutrition**. v.19, n.4, p.2603-2617, 2016.
- FAHLMAN, B.M.; KROL, E.S. UVA and UVB radiation-induced oxidation products of quercetin **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v.97, n. 3, 2, p.123-131.
- FAO. **FAOstat**. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#compare>> Acesso em 15 jan 2019.

FARAMARZI, A.; YADOLLAHI, BARZEGAR, M. ; SADRAEI, K. ; PACIFICO, S.; JEMRIĆ, T. Comparison of Phenolic Compounds' Content and Antioxidant Activity between Some Native Iranian Apples and Standard Cultivar 'Gala' Sh. **Journal agricultural Science Techniques**. v. 16, p. 1601-1611, 2014.

FATHY, S.M.; DREES, E.A. Protective effects of Egyptian cloudy apple juice and apple peel extract on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and inflammatory status in diabetic rat pancreas. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.11, n. 16, p.8, 2016.

FELICIANO RP, ANTUNES C, RAMOS A, SERRA AT, FIGUEIRA ME, DUARTE CMM, CARVALHO DA, BRONZE MR. Characterization of traditional and exotic apple varieties from Portugal. Part 1 – Nutritional, phytochemical and sensory evaluation. **Journal of Functional Foods**, n. 2, p. 35-45, 2010.

FENG, F.; MINGJUN, L.I.; FENGWANG M.A.; CHENG, L. Effects of location within the tree canopy on carbohydrates, organic acids, amino acids and phenolic compounds in the fruit peel and flesh from three apple (*Malus X domestica*) cultivars. **Horticulture Research**, v. 1 (14019), 2014.

FERRUCCI, L.M.; CARTMEL, B.; MOLINARO, A.M.; LEFFELL, D.J.; BALE, A.E.; MAYNE, S.T. Tea, coffee, and caffeine and early-onset basal cell carcinoma in a case-control study. **European journal of cancer prevention : the official journal of the European Cancer Prevention Organization (ECP)**. v. 23, n.4, p.296-302, 2014.

FOROUHI, N.G.; WAREHAM, N.J.. Epidemiology of diabetes. **Medicine** (Abingdon); v.42, n.12, p. 698–702, 2014.

FRANCIA-ARICHA, E. M.; GUERRA, M. T.; RIVAS-GONZALO, J. C.; SANTOS-BUELGA, C.. New Anthocyanin Pigments Formed after Condensation with Flavanols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 1997.

FRANCINI, A., SEBASTIANI, L. 2013. Phenolic Compounds in Apple (*Malus x domestica* Borkh.): Compounds Characterization and Stability during Postharvest and after Processing. **Antioxidants**. v.2, n. 3, p. 181, 2013.

FRIEDMAN, M., JÜRGENS, H. S.. Effect of pH on the Stability of Plant Phenolic Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n.6, p.2101-2110, 2000.

FRIEDMAN, M.; HENIKA, P.R.; LEVIN, C.E. Bactericidal Activities of Health-Promoting, Food-Derived Powders Against the Foodborne Pathogens *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, and *Staphylococcus aureus*. **Journal of Food Science** 78, M270-M275, 2013.

GARCIA-ALOY, M.; RODRÍGUEZ-MATEOS, A.; GIBNEY, E.R.; DUMONT, J.; MASSARO, M.; ET AL. A systematic review and meta-analysis of the effects of flavanol-containing tea, cocoa and apple products on body composition and blood lipids: Exploring the factors responsible for variability in their efficacy. **Nutrients**, v.9, p. 746, 2017.

GARCIA-SALAS, P.; MORALES-SOTO, A. ; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable amostras, **Molecules**, v. 15, n. 12, p. 8813–8826, 2010.

GARDNER, P. T.; WHITE, T. A. C.; MCPHAIL, D. B.; DUTHIE, G. G. The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. **Food Chemistry**, v. 68, p. 471–4. 2000.

GERHAUSER, C. Cancer chemopreventive potential of apples, apple juice, and apple components, *Planta Medica*, v. 74, n. 13, p. 1608-24, 2008.

GHOSH, D.; KONISHI, T. Anthocyanins and anthocyanin-rich extracts: Role in diabetes and eye function. **Asia Pacific Journal Clinical Nutrition**, v.16, p. 200–208, 2007.

GIAMPIERI, F. et al Photoprotective potential of strawberry (*Fragaria × ananassa*) extract against UV-A irradiation damage on human fibroblasts. **Agric Food Chem.** v.7;60, n.9, p.2322-7, Mar 2012.

GIOVANNONI, J.J. Completing a pathway to plant vitamin C synthesis, **PNAS**. v. 104, p. 9109-10. 2007.

GIRARDI, C.; BENDER, R.J. **Produção Integrada de Maçãs no Brasil**. Embrapa Uva e Vinho. Sistema de Produção, 1. ISSN 1678-8761 Versão Eletrônica. Jan/2003.

GODIC, A.; POLJŠAK, B.; ADAMIC, M.; DAHMANE, R. The Role of Antioxidants in Skin Cancer Prevention and Treatment. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**.v. 6, 2014.

GOLENIOWSKI, M.; BONFILL, M.; CUSIDO, R.; PALAZO'N, J. Phenolic acids. In: K.G. Ramawat, J.M. Me´rillon (eds.), **Natural Products**, 2013, p. 4151, Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

GONZÁLEZ, R., BALLESTER, I., LÓPEZ-POSADAS, R., SUÁREZ, M. D., ZARZUELO, A., MARTÍNEZ-AUGUSTIN, O., & MEDINA, F. S. D. Effects of Flavonoids and other Polyphenols on Inflammation. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.51, n.4, p. 331–362, 2011.

GORDON, L.G.; ROWELL, D. Health system costs of skin cancer and cost-effectiveness of skin cancer prevention and screening: a systematic review. **European Journal of Cancer Prevention**. v. 24, n. 2, p.141-9 mar 2015.

GORINSTEIN, S.; MARTIN-BELLOSO, O.; PARK, H.-S.; HARUENKIT, R.; LOJEK, A.; CIZ, M. et al. Comparison of some biochemical characteristics of different citrus fruits. **Food Chemistry**, v.74,p.309–15, 2001.

GRAM, L.; RAVN, L.; RASCH, M.; BRUHN, J.B.; CHRISTENSEN, A.B.; GIVSKOV, M. Food spoilage--interactions between food spoilage bacteria. **International Journal of Food Microbiology**. v.15, n.78(1-2), p.79-97, 2002.

GRIGORAS, C. G.; DESTANDAU, E.; FOUGÈRE, L.; ELFAKIR, C. Evaluation of apple pomace extracts as a source of bioactive compounds. **Industrial Crops and Products**, v.49, p. 794–804, v.

GROSSO, G. Effects of Polyphenol-Rich Foods on Human Health. **Nutrients**., v.10, n. 8, p.1089, ago 2018.

GRUIJL, F.R. Photocarcinogenesis: UVA vs. UVB radiation, **Journal of Applied Physiology** . v.15, p. 316–20. 2002.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutrition Reviews**, New York, v.52, n.8, p.253-65, 1994.

HALLIWELL, B., RAFTER, J., JENNER, A. 2005. Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not? **The American Journal of Clinical Nutrition**.v. 81, n. 1, p. 268S-276S.

HANCOCK, R.D.; VIOLA, R. Biosynthesis and catabolism of L-ascorbic acid in plants, **Crit. Rev. Plant Science**. v. 24, p.167-88. 2005.

HANHINEVA, K. et al. Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. **International journal of molecular sciences**, v. 11, n.4, p. 1365-402. 31 Mar. 2010.

HARRIS, S.A.; ROBINSON, J.P.; JUNIPER, B.E. Genetic clues to the origin of the apple. **Trends in genetics**. v. 18, n.8, p. 426-30, 2002.

HARRIS, Z.; DONOVAN, M.G.; BRANCO, G.M.; LINESAND, K.H.; BURD, R.Quercetin as an Emerging Anti-Melanoma Agent: A Four-Focus Area Therapeutic Development Strategy. **Frontiers Nutrition**. v.31, n.3, p.48. Out, 2016.

HE, X.; LIU, R.H. Phytochemicals of apple peels: isolation, structure elucidation, and their antiproliferative and antioxidant activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 12, n.56, p. 9905-10, 2008.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.13, n.10, p. 572–584, 2002.

HENRY-KIRK, R.A.; MCGHIE, T.K; ANDRE , C.M.; HELLENS, R.P. ALLAN, A.C. Transcriptional analysis of apple fruit proanthocyanidin biosynthesis. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 15, p. 5437–5450, 2012

HIDER, R.C.; LIU, Z.D.; KHODR, H.H. Metal chelation of polyphenols. **Methods in Enzymology**, v.335, p.190–203, 2001.

HIRSCH, G.E.; VIZZOTTO, M.; ABOY, A.L.; HENRIQUES, A.T.; EMANUELLI, T. Antioxidant activity of blackberry (rubus sp.) Genotypes from the southern region of Brazil. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**.v 31, n. 1, p. 2013.

HOLDERNESS, J.; HEDGES, J.F.; DAUGHENBAUGH, K. et al. Response of $\gamma\delta$ T cells to plant-derived tannins. **Critical reviews in immunology**. v.28, n.5, p.377-402, 2008.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias Do texto Oswaldo Cruz**, v.97, n. 7, p. 1027–1031, 2002.

- HUMMER, K.E.; JANICK, J. **Rosaceae: Taxonomy, economic importance, genomics** K. Folta, S. Gardiner (Eds.), Genetics and Genomics of Rosaceae, Springer, New York, p. 1-17, 2009.
- HURTADO, N. H.; MORALES, A. L.; GONZÁLEZ-MIRET, M. L.; ESCUDERO-GILETE, M. L.; HEREDIA, F. J. Colour, pH stability and antioxidant activity of anthocyanin rutinosides isolated from tamarillo fruit (*Solanum betaceum* Cav.). **Food Chemistry**, v.117, n.1, p.88–93, 2009.
- HUSSEIN, M. R. Ultraviolet radiation and pele cancer: molecular mechanisms. **Journal of Cutaneous Pathology**. v.32, p. 191–205, 2005.
- HYSON, D.A. A Comprehensive Review of Apples and Apple Components and Their Relationship to Human Health Advances in Nutrition: An International Review Journal. **Advances in Nutrition**, v. 2, p. 408-20, 2011.
- HYUN, T.K.; JANG, K. Apple as a source of dietary phytoNutrients: an update on the potential health benefits of apple. **Excli Journal**. v. 15, p. 565–569, 2016.
- IACOPINI, P.; CAMANGI, F.; STEFANI, A.; SEBASTIANI, L. Antiradical potential of ancient Italian apple varieties of *Malus _ domestica* Borkh.in a peroxyxynitrite-induced oxidative process. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 23, p. 518–24, 2010.
- IBGE. **Levantamento Sistema de Produção Agrícola**. Rio de Janeiro v.30 n.12 p.1-82 dezembro.2017
- IDF - INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, **Diabetes Atlas Eighth edition** 2017.
- IGLESIAS, I.; ECHEVERRER, G.; SORIA, H. Differences in fruit colour development, anthocyanin content, fruit quality and consumer acceptability of eight ‘Gala’ apple strains. **Scientia Horticulturae** 119, p.32–40, 2008
- INCA. Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Prevenção e controle do câncer: normas e recomendações do INCA. **Revista Brasileira Cancerologia**, v.48, n. 3, p. 317-32, 2002.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (USDA). Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx>. Acesso em: 22 maio 2019.
- ISHIKAWA, T.; DOWDLE, J.; SMIRNOFF, N. Progress in manipulating ascorbic acid biosynthesis and accumulation in plants. **Physiologia Plantarum**. v. 126, p. 343-55. 2006.
- IWAI, K.; KIM, M.H.; ONODERA, A.; MATSUE, H. Alpha-glicosidase inhibitory and antihyperglycemic effects of polyphenols in the fruit of *Viburnum dilatatum* Thunb. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**.v.54, p.4588–4592, 2006.
- JELODARIAN, S.; HAGHIR EBRAHIMABADI, A.; KHALIGHI, A.; BATOOLI, H. Evaluation of antioxidant activity of *Malus domestica* fruit extract from Kashan area. **Avicenna journal of phytomedicine**.v. 2, n. 3, p.139-145, 2012.
- JOHNSTON K.L., CLIFFORD M.N., MORGAN L.M. Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: Glycemic effects of

chlorogenic acid and caffeine. **American Journal Clinical Nutrition**.v. 78, p. 728–733, 2003.

JOHNSTON, K.L.; CLIFFORD, M.N.; MORGAN, L.M. Possible role for apple juice phenolic compounds in the acute modification of glucose tolerance and gastrointestinal hormone secretion in humans. **Journal of science Food Agricultural**, v.82, p.1800–1805, 2002.

JONGEN, H. **Fruit and Vegetable Processing**. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK, 2002.

KAHLE, K.; KRAUS, M.; RICHLING, E. Polyphenol profiles of apple juices. **Molecule Nutrition Food Research**.Aug; v.49, n. 8, p. 797-806, 2005.

KALINOWSKA, M.; BIELAWSKA, A.; LEWANDOWSKA-SIWKIEWICZ, H.; PRIEBE, H.; LEWANDOWSKI, H. Apples: content of phenolic compounds vs. variety, part of apple and cultivation model, extraction of phenolic compounds, biological properties. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.84, p.169–188, 2014.

KALITA, D. et al. Inhibition of α -glucosidase, α -amylase, and aldose reductase by potato polyphenolic compounds. **PloS one**. v. 13,1 Jan. 2018.

KAMMERER, J.; SCHWEIZER, C.; CARLE, R.; KAMMERER R. Recovery and fractionation of major apple and grape polyphenols from model solutions and crude plant extracts using ion exchange and adsorbent resin. **International Journal of Food Science Technology**,v.46, p. 1755–1767. 2011.

KANG, Chang-Geun et al. Evaluation of antimicrobial activity of the methanol extracts from 8 traditional medicinal plants. **Toxicological research** v. 27,n.1, p. 31-6, 2011.

KARAKAYA, S. Bioavailability of Phenolic Compounds. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(6), 453–464, 2004.

KARIMKHANI, C et al. The global burden of melanoma: results from the Global Burden of Disease Study 2015. **The British journal of dermatology**. v. 177, n.1 , p. 134-140, 2017.

KARIOTI, A.; SOKOVIC, M.; CIRIC, A.; KOUKOULITSA, C.; BILIA, A. R.; SKALTSA, H. Antimicrobial Properties of Quercus ilex L. Proanthocyanidin Dimers and Simple Phenolics: Evaluation of Their Synergistic Activity with Conventional Antimicrobials and Prediction of Their Pharmacokinetic Profile. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59, n.12, p. 6412-6422, 2011.

KELLETT, G.L.; BROT-LAROCHE, E. Apical GLUT2: a major pathway of intestinal sugar absorption. **Diabetes**. v.54, n.10, p.3056-62, out. 2005.

KIM, G.H.; KIM, J.E.; RHIE, S.J.; YOON, S. The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. **Experimental Neurobiology**. v.24, n.4, p.325-340, 2015.

KIM, H.; HE, H.H. Ultraviolet radiation-induced non-melanoma pele cancer: Regulation of DNA damage repair and inflammation. **Genes Dis**. 2014, 1, 188–198.

KIM, H.; KEOGH, J.B.; CLIFTON, P.M. Polyphenols and Glycemic Control. **Nutrients**, v. 8, n. 1, p. 17, 2016.

KLANOVICZ, Jó. Toxicidade e produção de maçãs no sul do Brasil. **História ciência e saúde**, Mangueiras, Rio de Janeiro , v. 17, n. 1, p. 67-85, Mar. 2010.

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

KORAĆ, R.R.; KHAMBHOLJA, K.M. Potential of herbs in skin protection from ultraviolet radiation. **Pharmacognosy Reviews**.v.5, n. 10, p. 164-173, 2011.

KOSTIĆ DA, VELICKOVIĆ JM, MITIĆ SS, MITIĆ MN, RANDELOVIĆ SS. Phenolic Content, and Antioxidant and Antimicrobial Activities of Crataegus Oxyacantha L (Rosaceae) Fruit Extract from Southeast Serbia. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 11, n.1p. 117-12, 2012.

KOUTSOS, A.; TUOHY, K.M.; LOVEGROVE, J.A. Apples and Cardiovascular Health—Is the Gut Microbiota a Core Consideration?. **Nutrients**. Jun; v.7, n.6, p. 3959–3998, 2015.

KSCHONSEK, J.; WOLFRAM, T.; STÖCKL, A.; BÖHM, V. Polyphenolic Compounds Analysis of Old and New Apple Cultivars and Contribution of Polyphenolic Profile to the In Vitro Antioxidant Capacity. **Antioxidants** (Basel, Switzerland), v.7, n.1, p. 20, 2018.

KUDUGUNTI, S.K. et al. Biochemical mechanism of Caffeic Acid Phenylethyl Ester (CAPE) selective toxicity towards melanoma cell lines. **Chemico-Biological Interactions**. v.6; n.188, n.1, p. 1–14, 2010.

KUMAR, R., BALAJI, S., UMA, T. S., & SEHGAL, P. K. Fruit extracts of Momordica charantia potentiate glucose uptake and up-regulate Glut-4, PPAR γ and PI3K. **Journal of Ethnopharmacology**, v.126, n.3, p. 533–537, 2009.

KUMAR, S.; PANDEY, A.K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **The Scientific World Journal**, v. 2013, n. 162750, Dez. 2013.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; TRONCOSO, A. M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.4, p. 726–732, 2005.

KUSUDA, M.; INADA, K.; OGAWA, T. O.; YOSHIDA, T.; SHIOTA, S.; TSUCHIYA, T.; HATANO, T. Polyphenolic constituent structures of Zanthoxylum piperitum fruit and the antibacterial effects of its polymeric procyanidin on methicillin-resistant Staphylococcus aureus. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 70, n.6, p. 1423-1431, 2006.

LA ROSA, L.A.; MORENO-ESCAMILLA, J.O.; RODRIGO-GARCÍA, J.; ALVAREZ-PARRILLA, E. Phenolic Compounds. 1.ed. Woodhead Publishing, 2018. p. 253-271. In: YAHIA, E.; CARRILLO-LOPEZ, A. (Org.). **Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables**, p. 510, 2018.

LAMBERT, J.D.; HONG, J.; YANG, G.; LIAO, J.; YANG, C.S. Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 81 n. 1 284S-291S, 2005.

ŁATA, B. Relationship between Apple Peel and the Whole Fruit Antioxidant Content: Year and Cultivar Variation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, n. 3, p. 663–671, 2007

LATA, B.; TRAMPCZYNSKA, A.; PACZESNA, J. Cultivar variation in apple peel and whole fruit phenolic composition. **Scientia Horticulturae**. v. 121, p. 176-81. 2009.

LATTANZIO, V. Phenolic Compounds: Introduction. In: K.G. Ramawat, J.M. Me´rillon (eds.), **Natural Products**, 2013, p. 4151, Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

LEE, D. H.; FRANCIS, F. J. Standardization of Pigment Analyses in Cranberries. **HortScience**, Stanford, v. 7, n. 1, p. 83-84, 1972.

LEE, H.C.; JENNER, A.M.; LOWAND, C.S.; LEE, Y.K. Efeito dos fenólicos do chá e seus metabólitos bacterianos fecais aromáticos sobre a microbiota intestinal . **Research Microbiology**. v.157, p. 876-84, 2006.

LEITER, U.; GARBE, C. Epidemiology of Melanoma and Nonmelanoma Pele Cancer—The Role of Sunlight. In: Reichrath J. (eds) Sunlight, Vitamin D and Pele Cancer. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 624. Springer, New York, NY, 2008.

LEONTOWICZ, H.; GORINSTEIN, S.; LOJEK, A.; LEONTOWICZ, M.; CIZ, M.; SOLIVA-FORTUNY, R.; PARK, H.; JUNG, S.; TRAKHTENBERG, S.; MARTIN-BELLOSO, O. Comparative content of some bioactive compounds in apples, peaches, and pears and their influence on lipids and antioxidant capacity in rats. **Jounal Nutrition Biochemistry**.v.13, p.603–610, 2002.

LEWANDOWSKA, U.; GORLACH, S.; OWCZAREK, K.; HRABEC, E.; SZEWCZYK, K. Synergistic interactions between anticancer chemotherapeutics and phenolic compounds and anticancer synergy between polyphenols. **Postepy Hig Med Dosw**. v. 2, n.68, p.528-40, 2014.

LI, H.R. et al. Effect of chlorogenic acid on melanogenesis of B16 melanoma cells. **Molecules** (Basel, Switzerland) v. 19,, n.9, p.12940-8. Ago. 2014.

LI, M.J.; MA, F.H.; ZHANG, M.; PU, F. Distribution and metabolism of ascorbic acid in apple fruits (*Malus domestica* Borkh cv. Gala). **Plant Science**. v. 174, p. 606-12. 2008.

LIAUDANSKAS, M. et al. Application of an Optimized HPLC Method for the Detection of Various Phenolic Compounds in Apples from Lithuanian Cultivars, **Journal of Chemistry**, v. 2014, 2014b.

LIAUDANSKAS, M. et al. Phenolic Composition and Antioxidant Activity of *Malus domestica* Leaves. **The Scientific World Journal**. v.2014, n. 10, 2014a.

LIN, D.; XIAO, M.; ZHAO, J.; LI, Z.; XING, B.; LI, X.; KONG, M.; LI, L.; ZHANG, Q.; LIU, H.; CHEN, H.; QIN, H.; WU, H.; CHEN, S. An Overview of Plant Phenolic Compounds and Their Importance in Human Nutrition and Management of Type 2 Diabetes. **Molecules**. v.15, n.21(10). p. E1374, Out 2016.

LIU, R.H.; SUN, J. Antiproliferative activity of apples is not due to phenolic-induced hydrogen peroxide formation, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 6, p. 1718-23, 2003.

LO PIPARO, E.; SCHEIB, H.; FREI, N.; WILLIAMSON, G.; GRIGOROV, M.; CHOU, C.J. Flavonoids for controlling starch digestion: Structural requirements for inhibiting human alpha-amylase. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, p.3555–3561, 2008.

LOBO, V.; PATIL, A.; PHATAK, A.; CHANDRA, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy Reviews** .v. 4, n. 8, p.110-126, 2010.

LOIZZO, M.R. et al. Native Colombian Fruits and Their by-Products: Phenolic Profile, Antioxidant Activity and Hypoglycaemic Potential. **Foods**. v. 3, n.8, 2019.

LOU, S.-N.; LIN, Y.-S.; HSU, Y.-S.; CHIU, E.-M.; HO, C.-T. Soluble and insoluble phenolic compounds and antioxidant activity of immature calamondin affected by solvents and heat treatment. **Food Chemistry**, v.161, p.246–253, v.

LU, Y.; FOO, L. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. **Food Chemistry**, v.68, n.1, p. 81–85, 2000.

MAHATTANATAWEE, K.; MANTHEY, J. A.; LUZIO, G.; TALCOTT, S. T.; GOODNER, K.; BALDWIN, E. A. Total antioxidant activity and fiber content of select Florida-grown tropical fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, n.19, p.7355–7363, 2006.

MAJO, D.D.; GUARDIA, M.L.; GIAMMANCO, S.; NEVE, L.L.; GIAMMANCO, M. The antioxidant capacity of red wine in relationship with its polyphenolic constituents. **Food Chemistry**, v.111, p.45–9, 2008.

MALUNGA, L. N., JOSEPH THANDAPILLY, S., AMES, N. Cereal-derived phenolic acids and intestinal alpha glucosidase activity inhibition: Structural activity relationship. **Journal of Food Biochemistry**, v.e12635, p.1-6, 2018.

MANACH, C.; WILLIAMSON, G.; MORAND, C.; SCALBERT, A.; RÉMÉSY, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.81, n.1, p.230S-42S, 2005.

MANDALARI et al. Antimicrobial activity of flavonoids extracted from bergamot (*Citrus bergamia* Risso) peel, a byproduct of the essential oil industry. **Journal of Applied Microbiology**. v. 103, n.6, p. 2056-2064, dez, 2007

- MANZANO, S.; WILLIAMSON, G. Polyphenols and phenolic acids from strawberry and apple decrease glucose uptake and transport by human intestinal Caco-2 cells. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 54, p.1773–1780, 2010.
- MARCHEV, A.S.; IVANOV, I.; VRANCHEVA, R.; PAVLOV, A. Solid phase extraction and HPLC determination of phloridzin in natural products. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, v.19, n.(2), p. 201–203, 2013.
- MARINHO D. ET AL . Intensidade de pigmentação vermelha em maçãs e sua relação com os teores de compostos fenólicos e capacidade antioxidativa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas , v. 29, n. 1, p. 148-154, Mar. 2009 .
- MARKS, S.C.; MULLEN, H.; BORGES, G.; CROZIER, A. Absorption, metabolism, and excretion of cider dihydrochalcones in healthy humans and subjects with an ileostomy. **Journal Agricultural Food Chemistry** , v. 57, p. 2009–2015, 2009.
- MARTINEZ, J.C.; OTLEY, C.C. The management of melanoma and nonmelanoma pele cancer: A review for the primary care physician. **Mayo Clinical Proc Therapy**, v.76 , p. 1253-1265, 2001.
- MASUDA, I. et al. Apple procyanidins promote mitochondrial biogenesis and proteoglycan biosynthesis in chondrocytes. **Scientific reports**. v. 8, n.1, p.7229. 8 Mai. 2018.
- MATATALL, K.A.; AGAPOVA, O.A.; ONKEN, M.D.; WORLEY, L.A.; BOWCOCK, A.M.; HARBOUR, J.H. BAP1 deficiency causes loss of melanocytic cell identity in uveal melanoma. **BMC Cancer**. v. 13, p. 371, 2013.
- MATSUI T, UEDA T, OKI T, SUGITA K, TERAHARA N, MATSUMOTO K. alpha-Glucosidase inhibitory action of natural acylated anthocyanins. 1. Survey of natural pigments with potent inhibitory activity. **Journal Agricultural Food Chemistry**., v. 49, n. 4, p.1948-51, 2001.
- MCDUGALL, G. J. Phenolic-enriched foods: sources and processing for enhanced health benefits. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.76, n.02, p. 163–171, 2017.
- MILENKOVIC, D.; DEVAL, C.; DUBRAY, C.; MAZUR, A.; MORAND, C. Hesperidin Displays Relevant Role in the Nutrigenomic Effect of Orange Juice on Blood Leukocytes in Human Volunteers: A Randomized Controlled Cross-Over Study. **PLoS One**, v.6, n. 26669, 2011.
- MOO-HUCHIN, V.M.; MOO-HUCHIN, M.I.; ESTRADA-LEON, R.J.; CUEVAS-GLORY, L.; ESTRADA-MOTA, I.A.; ORTIZ-VAZQUEZ, E.; BETANCUR-ANCONA, D.; SAURI-DUCH, E. Antioxidant compounds, antioxidant activity and phenolic content in peel from three tropical fruits from Yucatan, Mexico. **Food Chemistry**, v. 166, p. 17–32. 2015.
- MOSHAMMER, H.; SIMIC, S.; HALUZA, D. UV-Radiation: From Physics to Impacts. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v.14, n.2, p. 200, 2017.

- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. **Journal Immunology Methods**, v.65, p.55-63, 1983.
- MOTHANA, R. A. A.; LINDEQUIST, U. Antimicrobial activity of some medicinal plants of the island Soqatra. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, n. 1-2, p. 177-181, 2005.
- MUKNE, A.P.; VISWANATHAN, V.; PHADATARE, A.G. Structure pre – requisites for isoflavones as effective antibacterial agents. **Pharmacognosy Review**, v.5, n.9, p. 13 – 18, 2011.
- MUNIN, A.; EDWARDS-LÉVY, F. Encapsulation of Natural Polyphenolic Compounds; **A Review Pharmaceutics**.v. 3, n.4, p. 793–829, dez 2011.
- NAVARRO, M.; MOREIRA, I.; ARNAEZ, E.; QUESADA, S.; AZOFEIFA, G.; VARGAS, F.; ALVARADO, D.; CHEN, P. Polyphenolic Characterization and Antioxidant Activity of *Malus domestica* and *Prunus domestica* Cultivars from Costa Rica. **Foods**, v. 7, n. 2, p. 15, 2018.
- NIJVELDT, R.J.; VAN NOOD, E.; VAN HOORN, D.E.C.; BOELEN, P.G.; VAN NORREN, K.; VAN LEEUWEN, P.A.M. Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.74, p.418–425, 2001.
- NINOMIYA, M.; KOKETSU, M. Minor Flavonoids (Chalcones, Flavanones, Dihydrochalcones, and Aurones). In: K.G. Ramawat, J.M. Me´rillon (eds.), **Natural Products**, 2013, p. 4151, Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- NOH, S.U., CHO, E.A., KIM, H.O., AND PARK, Y.M. Epigallocatechin- 3-gallate improves Dermatophagoides pteronissinus extract-induced atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice by suppressing macrophage migration inhibitory factor. **International Immunopharmacol.** v.8, p.1172–1182, 2008.
- NOITON, D.A.M.; ALSPACH, P.A. Founding clones, inbreeding, coancestry, and status number of modern apple cultivars. Journal of the American Society for Horticultural Science. **American Society for Horticultural Science**, v. 121, p. 773–782, 1996.
- NYAMBE--SILAVWE, H.; WILLIAMSON, G. Chlorogenic and phenolic acids are only very weak inhibitors of human salivary α -amylase and rat intestinal maltase activities. **Food Research International**. v.113, p. 452–455, 2018.
- OKI, T.; MASUDA, M.; FURUTA, S.; NISHIBA, Y.; TERAHARA, N.; SUDA, A.I. Involvement of anthocyanins and other phenolic compounds in radical scavenging activity of purple-fleshed sweet potato cultivars. **Journal Food Science**, 67, 1752–1756, 2001.
- OLENNIKOV, D. N. et al. Bioactive Phenolics of the *Genus Artemisia* (Asteraceae): HPLC-DAD-ESI-TQ-MS/MS profile of the siberian species and their inhibitory potential against α -amylase and α -glucosidase. **Frontiers in pharmacology**. v. 9, n.12, p.756. Jul. 2018.
- OLIVEIRA, B.D.Á.; RODRIGUES, A.C.; CARDOSO, B.M.I.; RAMOS, A.L.C.C.; BERTOLDI, M.C.; TAYLOR, J.G.; CUNHA, L.R.D.; PINTO, U.M. Antioxidant, antimicrobial and anti-quorum sensing activities of *Rubus rosaefolius* phenolic extract. **Industrial Crops and Products**, v.84, p. 59-66, 2016.

- OLIVEIRA, F.C. de et al. Jabuticaba skin extracts: phenolic compounds and antibacterial activity. **Brazilian Journal Food Technology**, Campinas , v. 21, n.e2017108, 2018 .
- OLIVEIRA, L.L.; CARVALHO, M.V.; MELO, L. Health promoting and sensory properties of phenolic compounds in food. **Revista Ceres**, Viçosa , v. 61, p. 764-779, Dec. 2014 .
- OSZMIANSKI, J., RAMOS, T., BOURZEIX, M.. Fractionation of Phenolic Compounds in Red Wine. **American Journal of Enology and Viticulture**. v.39, n. 3 , p. 259-262, 1988.
- PACHECO-ORDAZ, R. et al. Efeito de compostos fenólicos no crescimento de bactérias probióticas e patogênicas selecionadas. **Lett Appl Microbiology**.v. 66, p. 25–31, 2018.
- PACHECO-PALENCIA, L.; HAWKEN, P.; TALCOTT, S. Phytochemical antioxidant and pigment stability of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) as affected by clarification, ascorbic acid fortification and storage. **Food Research International**, v.40, p.620–628, 2007.
- PARK, K. Role of MicroNutrients in Pele Health and Function. **Biomolecules & Therapeutics**. v.23, n.3, p.207-217, 2015.
- PATEL, D.H.; SHARMA, N. Inhibitory effect of quercetin on epithelial to mesenchymal transition in SK-MEL-28 human melanoma cells defined by in vitro analysis on 3D collagen gels. **OncoTargets and therapy**, v. 9, p. 6445-6459, oct. 2016.
- PATWARDHAN, J.; BHATT, P. Ultraviolet-B Protective Effect of Flavonoids from *Eugenia caryophyllata* on Human Dermal Fibroblast Cells. **Pharmacognosy Magazine.**; v.11(Suppl 3), p. S397–S406, Out 2015.
- PELINSON, L. P. et al. Antiproliferative and apoptotic effects of caffeic acid on SK-Mel-28 human melanoma cancer cells. **Molecular Biology Reports**. 2019
- PHAN MAT, WANG J, TANG J, LEE YZ, NG K. Evaluation of α -glucosidase inhibition potential of some flavonoids from *Epimedium brevicornum*. **LWT - Food Science and Technology**. 2013;53(2):492-498.
- PLISZKA, B.; HUSZCZA-CIOŁKOWSKA, G.; JANUSZEWICZ, E.; WARMIŃSKA-RADYKO, I. Stability, microbiological quality, and antioxidant properties of extracts from berry fruits. **Acta Alimentaria**, v.42, n.2, p. 256–263, 2013.
- POLLITT, E.J.G.; SZKUTA, P.T.; BURNS, N.; FOSTER, S.J.; PRINCE, A. Staphylococcus aureus infection dynamics. **PLoS Pathogens** v.14, n. 6, p. e1007112, Jun 2018.
- PRABHAKAR, P.K.; DOBLE, M. Effect of Natural Products on Commercial Oral Antidiabetic Drugs in Enhancing 2-Deoxyglucose Uptake by 3T3-L1 Adipocytes. **Therapeutic advances in endocrinology and metabolism**. v. 2, n.3, p.103–114, jun 2011.
- PRASAD, R.; KATYAR, S.H.K. Polyphenols from green tea inhibit the growth of melanoma cells through inhibition of class I histone deacetylases and induction of DNA damage. **Genes e cancer**, v. 6,1-2, p. 49-61, 2015.

- PRAWAT, U.; CHAIRERK, O.; PHUPORNPRASERT, U.; SALAE, A. W.; TUNTIWACHWUTTIKUL, P. Two New C-benzylated Dihydrochalcone Derivatives from the Leaves of *Melodorum siamensis*. **Planta Medicine**, v.79, n.1, p. 83-86, 2013.
- QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 68-76, 2001.
- RAMASAMY K, SHANMUGAM M, BALUPILLAI A, GOVINDHASAMY K, GUNASEELAN S, MUTHUSAMY G, et al.. Ultraviolet radiation-induced carcinogenesis: Mechanisms and experimental models. **Journal of Radiation Research**, v.8 , p. 4-19, 2017.
- RANA, S.; BHUSHAN, S. Apple phenolics as nutraceuticals: assessment, analysis and application. **Jounal Food Science Technology**. v. 53, n. 4, p. 1727–1738, 2016.
- RANDHAWA, V.; SHARMA, P.; BHUSHAN, S.; BAGLER, G. Identification of Key Nodes of Type 2 Diabetes Mellitus Protein Interactome and Study of their Interactions with Phloridzin. **OMICS: A Journal of Integrative Biology**, v.17, n.6, p. 302–317, 2013.
- RAO, K.S.; CHAUDHURY, P.K.; PRADHAN, A. Evaluation of anti-oxidant activities and total phenolic content of *Chromolaena odorata*. **Food Chemistry Toxicology**, v. 48, p.729–732, 2010.
- RASOULI, H.; HOSSEINI-GHAZVINI, S.M.; ADIBI, H'; KHODARAHMI, R. Differential α -amylase/ α -glucosidase inhibitory activities of plant-derived phenolic compounds: a virtual screening perspective for the treatment of obesity and diabetes. **Food and Function**, v.24, n.8(5), p. 1942-1954, 2017.
- RASTOGI R. P., RICHA, KUMAR A., TYAGI M. B., SINHA R. P. Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair. **Jounal Nucleic Acids**. 592980, 2010.
- RAWAT, S. Food Spoilage: Microorganisms and their prevention. **Asian Journal of Plant Science and Research**. v.5, n.4, p.47-56, 2015.
- REAGAN-SHAW, S., EGGERT, D., MUKHTAR, H., AHMAD, N. Antiproliferative Effects of Apple Peel Extract Against Cancer Cells. **Nutrition and Cancer**. v.62, p. 4 517-524, 2010.
- REDDY, C. V. K.; SREERAMULU, D.; RAGHUNATH, M. Antioxidant activity of fresh and dry fruits commonly consumed in India. **Food Research International**, v.43, n.1, p. 285–288, 2010.
- REY, D.P.; OSPINA, L.F.; ARAGÓN, D.M. Inhibitory effects of an extract of fruits of *Physalis peruviana* on some intestinal carbohydrases. **Revista Colombiana de Ciências Químico Farmacêuticas**. v. 44, n.1, p. 72-89, 2015.
- RICCIO, G.; MAISTO, M.; BOTTONE, S.; BADOLATI, N.; ROSSI, G.B.; TENORE, G.C.; STORNAIUOLO, M.; NOVELLINO, E. Wnt inhibitory activity of *malus pumila miller* cv *annurca* and *malus domestica* cv *limoncella* apple extracts on human colon-rectal cells carrying familial adenomatous polyposis mutations. **Nutrients**, v. 9, p.1262, 2017.

RODRIGUEZ, J.; YÁÑEZ, J.; VICENTE, V.; ALCARAZ, M.; BENAVENTE-GARCÍA, O.; CASTILLO, J.; LOZANO, J. A. Effects of several flavonoids on the growth of B16F10 and SK-MEL-1 melanoma cell lines: relationship between structure and activity. **Melanoma Research**, v.12, n.2, p. 99–107, 2002.

ROSS, K. A.; FUKUMOTO, L.; GODFREY, D. Influence of variety, storage, and simulated gastrointestinal digestion on chemical composition and bioactivity of polysaccharides from sweet cherry and apple tree fruits. **Journal Cogent Food & Agriculture**, v.1, p.18-21, 2015.

RUPASINGHE, H.P.V; KATHIRVEL, P.; HUBER, G.M.Ultrasonication-Assisted Solvent Extraction of Quercetin Glycosides from 'Idared' Apple Peels. **Molecules**, v.16, p. 9783-9791, 2011.

RUPASINGHE, H.P.V., YASMIN, A. Inhibition of oxidation of aqueous emulsions of omega-3 fatty acids and fish oil by phloretin and phloridzin. **Molecules**, v.15, p.251–257, 2010.

SADIQ, Muhammad Bilal et al. Antibacterial Activities and Possible Modes of Action of *Acacia nilotica* (L.) Del. against Multidrug-Resistant *Escherichia coli* and *Salmonella*. **Molecules**, Basel, Switzerland, v. 22, n.1, 47Jan. 2017.

SAEIDNIA S.; ABDOLLAHI M. Toxicology and Applied Pharmacology Invited Review Article Antioxidants: Friends or foe in prevention or treatment of cancer: The debate of the century. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 271, n. 1, p.49-63, 2013.

SAK, K. Anticancer effects of flavonoids on melanoma cells: are murine cells more sensitive compared to humans? **International Journal of Phytomedicine**. v. 5, n. 4, p. 441-445, 2013.

SAK, K. Cytotoxicity of dietary flavonoids on different human cancer types. **Pharmacognosy Reviews**.v.8, n.16, p.122-146, 2014.

SALES, P. M. SOUZA, P.M.; SIMEONI, L.A.; SILVEIRA, D. α -Amylase inhibitors: a review of raw material and isolated compounds from plant source, **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.15, p. 141–183, 2012.

SANTOS, P. F. P. et al . Polyphenol and triterpenoid constituents of *eugenia florida* dc. (myrtaceae) leaves and their antioxidant and cytotoxic potential. **Química Nova**, São Paulo , v. 41, n. 10, p. 1140-1149, Dec. 2018

SARAVANAN, S.; PARIMELAZHAGAN, T. In vitro antioxidant, antimicrobial and anti-diabetic properties of polyphenols of *Passiflora ligularis* Juss. fruit pulp. **Food Sci Hum Wellness** v.3, p. 56–64, 2014.

SARINYA AKKARACHIASIT 1 , PIYAWAN CHAROENLERTKUL 1 , SIRINTORN YIBCHOK-ANUN 1 AND SIRICHAIRADISAKWATTANA 2,* Inhibitory Activities of Cyanidin and Its Glycosides and Synergistic Effect with Acarbose against Intestinal α -Glucosidase and Pancreatic α -Amylase. **International Journal of Molecular Sciences**v.11, p.3387-3396, 2010.

- SASSI, A. et al. Chrysin, a natural and biologically active flavonoid suppresses tumor growth of mouse B16F10 melanoma cells: In vitro and In vivo study. **Chemico-Biological Interactions**. v. 283, p.10-19, 2018.
- SATOH T, IGARASHI M, YAMADA S, TAKAHASHI N, WATANABE K. INHIBITORY effect of black tea and its combination with acarbose on small intestinal α -glucosidase activity. **Journal of Ethnopharmacology**. v.161, p.147-155, 2015.
- 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, p.24–33, 2006.
- SCHIEBER, A.; KELLER, P.; CARLE, R. Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.910, n. 2, p. 265–273, 2001.
- SCHMIDT JS, LAURIDSEN MB, DRAGSTED LO, NIELSEN J, STAERK D Development of a bioassay-coupled HPLC-SPE-ttNMR platform for identification of α -glucosidase inhibitors in apple peel (*Malus domestica* Borkh.). **Food Chemistry**, v.135, p. 1692–1699, 2012.
- SCHMITZ, E.; NOGA, G. Quantification and reduction of UVB induced damage in *Phaseolus vulgaris* leaves and *Malus domestica* fruits. **Angewandte Botanik**. v.75, p. 53–58, 2001.
- SCHULZE, C.; BANGERT, A.; KOTTRA, G.; GEILLINGER, K.E.; SCHWANCK, B.; VOLLERT, H.; BLASCHEK, H.; DANIEL, H. Inhibition of the intestinal sodium-coupled glucose transporter 1 (SGLT1) by extracts and polyphenols from apple reduces postprandial blood glucose levels in mice and humans. **Molecular Nutrition & Food Research**., 58, 1795–1808, 2014.
- SEGUIN, J.; BRULLÉ, L.; BOYER, R.; LU YM, RAMOS ROMANO M, TOUIL YS, SCHERMAN, D.; BESSODES M.; MIGNET N.; CHABOT, G.G. Liposomal encapsulation of the natural flavonoid fisetin improves bioavailability and antitumor efficacy. **International Journal of Pharmaceutics**. v.444, n.1-2, p.146-54, 2013.
- SEPAHPOUR, S et al. Comparative Analysis of Chemical Composition, Antioxidant Activity and Quantitative Characterization of Some Phenolic Compounds in Selected Herbs and Spices in Different Solvent Extraction Systems. **Molecules**, v. 23, n. 2, p. 402, 2018.
- SEVIN, A.; OZTAS, P.; SENEN, D.; HAN, U.; KARAMAN, C.; TARIMCI, N.; KARTAL, M.; ERDOGAN, B. Effects of polyphenols on skin damage due to ultraviolet A rays: An experimental study on rats. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v.21, p.650–656, 2007.
- SHIN, H. A. et al. Radioprotective effect of epicatechin in cultured human fibroblasts and zebrafish. **Journal of radiation research**, v. 55, n.1,p. 32-40, 2013.
- SHOJI, T.; AKAZOME, H.; KANDA, T.; IKEDA, M. The toxicology and safety of apple polyphenol extract. **Food and Chemical Toxicology**. v. 42, n.6, p. 959-967, 2004.

- SIES, H. Strategies of antioxidant defence. Review. **European Journal of Biochemistry, Berlin**, v.215, n.2, p.213-9, 1993.
- SILHAVY, T. J.; KAHNE, D.; WALKER, S. The bacterial cell envelope. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 2, n.5, a000414, 2010.
- SIMMONDS, M. S. J.; HOWES, M.-J. R. Profile of Compounds in Different Cultivars of Apple (*Malus x domestica*). **Nutritional Composition of Fruit Cultivars**, v. 1, n.18, 2016.
- SINGH, A. P., WILSON, T., KALK, A. J., CHEONG, J., VORSA, N. Isolation of specific cranberry flavonoids for biological activity assessment. **Food Chemistry**. v.116, p. 4 963-968, 2009.
- SNYDER, S.M. et al. Consumption of Quercetin and Quercetin-Containing Apple and Cherry Extracts Affects Blood Glucose Concentration, Hepatic Metabolism, and Gene Expression Patterns in Obese C57BL/6J High Fat-Fed Mice. **Journal Nutrition**.v.146, n.5, p.1001-7, 2016.
- SOHN, H. Y.; SON, K. H.; KWON, C. S.; KWON, G. S.; KANG, S. S. Antimicrobial and cytotoxic activity of 18 prenylated flavonoids isolated from medicinal plants: *Morus alba* L., *Morus mongolica* Schneider, *Broussonetia papyrifera* (L.) Vent, *Sophora flavescens* Ait and *Echinophora koreensis* Nakai. **Phytomedicine**, Jena , v.11, n.7-8, p. 666-672, 2004.
- SOLOVCHENKO, A.; SCHMITZ-EIBERGER, M. Significance of peel flavonoids for UV-B protection in apple fruits, **Journal of Experimental Botany**. v. 54, p. 1977-984. 2003.
- SONG, H.; 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. **The Journal of the American College of Nutrition**.v. 24, p.376–384, 2005.
- STEFFENS, C.A.; GUARIENTI, A.J.H.; STORCK, L.; BRACKMANN, A. Maturação da maçã 'Gala' com a aplicação pré-colheita de aminoetoxivinilglicina e ethephon. **Ciência Rural**, v. 36, n.2, 434-40, 2006.
- SUN, H.N.; MU, T.H.; XI, L.S. Effect of pH, heat, and light treatments on the antioxidant activity of sweet potato leaf polyphenols. **International Journal of Food properties**, v. 20, n. 2, p.318–332, 2017.
- SUN, J., CHU, H.-F., WU, X., & LIU, R. H. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 50, p. 7449–54. 2002.
- SUSREZ, B.; PICINELLI, A.; MANGAS, J.J. A Solid-phase extraction and high-performance liquid chromatographic determination of polyphenols in apple musts and ciders **Journal of Chromatography A**, Spain, v. 727, p. 203-209, 1996.
- SWAIN, T., HILLIS, W. E. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v.10, n. 1, p. 63-68, 1959.

TADERA, K.; MINAMI, H.; TAKAMATSU, K.; MATSUOKA, T. Inhibition of alpha-glicosidase and alpha- amylase by flavonoids. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**. Tokyo, v.52, p.149–153, 2006.

TAN, L.C.; WANG, Q.; LUO, C.; CHEN, S.; LI, Q.; LI, P. Yeast α -Glicosidase Inhibitory Phenolic Compounds Isolated from *Gynura medica*. **International Journal of Molecular Sciences**, v.14, n.2, p. 2551–2558, 2013.

TANIGAWA, T. (+)-Catechin protects dermal fibroblasts against oxidative stress-induced apoptosis. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. v.14, p.133, 2014.

TEMPLE, N.J. Antioxidants and disease: more questions than answers. **Nutrition Research** v. 20, p. 449-59, 2000.

TENTORI, L.; LACAL, P. M.; GRAZIANI, G., Challenging resistance mechanisms to therapies for metastatic melanoma. **Trends in Pharmacological Sciences**. v.34 n.12,p. 656-666, 2013.

TIAGO, M., DE OLIVEIRA, E. M., BROHEM, C. A., PENNACCHI, P. C., PAES, R. D., HAGA, R. B., MARIA-ENGLER, S. S. Fibroblasts Protect Melanoma Cells from the Cytotoxic Effects of Doxorubicin. **Tissue Engineering**. Part A, v.20(17-18), p. 2412–2421, 2014.

TONG, S.H.C.; DAVIS, J.S.; EICHENBERGER, EM.; HOLLAND, T.L.; FOWLER, VG. Staphylococcus aureus Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. **Clinical Microbiology Reviews**, v.28, n3, p. 603–661, 2015.

TREUTTER, D. Biossíntese de compostos fenólicos e sua regulação em macieira. **Plant Growth Regulation**, v. 34, p. 71-89, 2001.

TSAO, R.; YANG, R. Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.1018, p.29-40, 2003.

TSAO, R.; YANG, R.; XIE, S.; Sockovie, E.; Khanizadeh, S.. Which polyphenolic compounds contribute to the total antioxidant activities of apple? *Journal Agricultural Food Chemistry*, v. 53, p. 4989-4995, 2005.

TSAO, R.; YANG, R.; YOUNG, J. C.; ZHU, H. Polyphenolic Profiles in Eight Apple Cultivars Using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51(21), 6347–6353, 2003.

TUNG MUNNITHUM, Duangjai et al. Flavonoids and Other Phenolic Compounds from Medicinal Plants for Pharmaceutical and Medical Aspects: An Overview. **Medicines** (Basel, Switzerland) v. 5,n.3, p.93. 2018,

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Disponível em: < <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/>>. Acesso em: 21 maio 2019.

USP. Universidade de São Paulo. **TBCA- Tabela Brasileira de Composição de Alimentos** . Tabelas Complementares Flavonoides.Versão 6.0. 2017.

VANZANI, P.; ROSSETTO, M.; RIGO, A.; VRHOVSEK, U.; MATTIVI, F.; D'AMATO, E.; SCARPA, M. Major phytochemicals in apple cultivars: contribution to peroxy radical trapping efficiency. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 9, p. 3377–82, 2005.

VAUZOUR, D. et al. Polyphenols and human health: prevention of disease and mechanisms of action. **Nutrients** v. 2, n.11, p.1106-31, 2010.

VEERIAH, S.; HOFMANN, T.; GLEI, M.; DIETRICH, H.; WILL, F.; SCHREIER, P.; KNAUP, B.; POOL-ZOBEL, B.L. Apple polyphenols and products formed in the gut differently inhibit survival of human cell lines derived from colon adenoma (LT97) and carcinoma (HT29). **Journal Agricultural Food Chemistry**. v.55: p. 2892–900. 2007.

VERMA, A.; LAAKSO, I.; SEPPÄNEN-LAAKSO, T.; HUHTIKANGAS, A.; RIEKKOLA, M.-L. A Simplified Procedure for Indole Alkaloid Extraction from *Catharanthus roseus* Combined with a Semi-synthetic Production Process for Vinblastine. **Molecules**. v.12, p. 1307-1315, 2007.

VIEIRA, F.G.K.; BORGES, G.S.C; COPETTI, C.; AMBONI, R.D..C.; DENARDI, F.; FETT, R. Physico-chemical and antioxidant properties of six apple cultivars (*Malus domestica* Borkh) grown in southern Brazil **Scientia Horticulturae**. v.122, Issue 3, 1 October, p. 421-425, 2009.

VIEIRA, F.G.K.; BORGES, G.S.C; COPETTI, C.; COPETTI, C.; DI PIETRO, P.F.; NUNES, E. C.; FETT, R. Phenolic compounds and antioxidant activity of the apple flesh and peel of eleven cultivars grown in Brazil. **Scientia Horticulturae**, v 128, p. 261–266, 2011.

VILELA, P. **Maçã. Fruteira típica de clima temperado, a cultura da maçã é uma das atividades que mais recebe investimento em tecnologia e qualidade no país.** Disponível em: < http://gestaoportal.sebrae.com.br/setor/fruticultura/o-setor/frutas-de-g-a-z/maca/maca-104.3/BIA_1043>. Acesso em agos 2014.

VINHOLES, J.; GROSSO, C.; ANDRADE, P. B; GIL-IZQUIERDO, A.; VALENTÃO, P., PINHO, P. G. D.; FERRERES, F. In vitro studies to assess the antidiabetic, anti-cholinesterase and antioxidant potential of *Spergularia rubra*. **Food Chemistry**, v. 129, n.2, p. 454–462, 2011.

VINHOLES, J.; VIZZOTTO, M. Synergisms in Alpha-glucosidase Inhibition and Antioxidant Activity of *Camellia sinensis* L. Kuntze and *Eugenia uniflora* L. Ethanolic Extracts. **Pharmacognosy research**, v. 9,1, p. 101-107, 2017.

VIZZOTTO, M.; PORTER, H.; BYRNE, D.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Polyphenols of selected peach and plum genotypes reduce cell viability and inhibit proliferation of breast cancer cells while not affecting normal cells. **Food Chemistry**. v. 164, n, 1, p. 363-370, 2014.

VOGT T. Phenylpropanoid Biosynthesis. **Molecular Plant**, v.3, p.02-10, 2010.

VUOLO, M.M ; LIMA, V. S. ; MARÓSTICA JR. MR. **Phenolic Compounds: Structure, Classification, and Antioxidant Power.** In: Maira Rubi Segura Campos. (Org.). *Bioactive*

Compounds Health Benefits and Potential Applications. 1ed.Duxford: Elsevier, 2018, v. 1, p. 33-52.

WAINSTEIN, Alberto J. A.; BELFORT, Francisco A.. Conduta para o melanoma cutâneo. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, Rio de Janeiro , v. 31, n. 3, p. 204-214, June 2004

WALDECKER, M.; KAUTENBURGER, T.; DAUMANN, H.; VEERIAH, S.; WILL, F.; DIETRICH, H.; POOL-ZOBEL, B.L.; SCHRENK, D. Histone-deacetylase inhibition and butyrate formation: Fecal slurry incubations with apple pectin and apple juice extracts. **Nutrition**. v.24, n.4, p.366-74.

WANG JJ, SHI QH, ZHANG W, SANDERSON BJ. Anti-skin cancer properties of phenolic-rich extract from the pericarp of mangosteen (*Garcinia mangostana* Linn.). **Food Chemistry Toxicology**. v.50, n. 9, p3004-13, 2012 Sep.

WANG, E. et al. Antiproliferative and proapoptotic activities of anthocyanin and anthocyanidin extracts from blueberry fruits on B16-F10 melanoma cells. **Food & nutrition research** v. 61,n.1 ,p.1325308. 19 Jun. 2017.

WANG, S. et al. Bacteriostatic Effect of Quercetin as an Antibiotic Alternative In Vivo and Its Antibacterial Mechanism In Vitro. **Journal of Food Protection**, v.81, n.1, p.68-78, 2018.

WANG, S.Q.; ZHU, X.F.; WANG, X.N.; SHEN, T.; XIANG, F.; LOU, H.X. Flavonoids from *Malus hupehensis* and their cardioprotective effects against doxorubicin-induced toxicity in H9c2 cells. **Phytochemistry**, v. 87, p. 119-125, 2013.

WANG, X.; LI, C.; LIANG, D.; ZOU, H.; LI, P.; MA, F. Phenolic compounds and antioxidant activity in red-fleshed apples. **Journal of Functional Foods**, 2014.

WASSON, G. R., MCKELVEY-MARTIN, V. J., DOWNES, C. S. 2008. The use of the comet assay in the study of human **Nutrition and Cancer**. *Mutagenesis*. 23: 3 153-162.

WEINSTEIN, D.; LEININGER, J.; HAMBY, C.; SAFAI, B. Diagnostic and **Prognostic Biomarkers in Melanoma**. *The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology*, v.7, n.6, p.13-24, 2014.

WHO Media Centre. **Diarrhoeal disease**, Fact sheet N330. 2013. [[cited 2019 Jan 24]]. Available from: URL: <http://H.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/en/index.html>.

WILLIAMSON, G. Possible effects of dietary polyphenols on sugar absorption and digestion. **Molecular Nutrition & Food Research**. v.57, n.1, p.48-57, Jan 2013.

WILLIAMSON, G.; HOLST, B. Dietary reference intake (DRI) value for dietary polyphenols: are we heading in the right direction?. **British Journal Nutrition**; v.99 Suppl 3:S, p.55-8, 2008.

WILLIAMSON, G.; MANACH, C. Bioavailability and bio efficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. **American Journal Clinical Nutrition**. v.81, sp243–55, 2005.

- WITTENAUER, J., MÄCKLE, S., SUßMANN, D., SCHWEIGGERT-WEISZ, U., CARLE, R.. Inhibitory effects of polyphenols from grape pomace extract on collagenase and elastase activity. **Fitoterapia**. v. 101, p. 179-187, 2015.
- WOJDYLO, A.; OSZMIANSKI, J.; LASKOWSKI, P., Polyphenolic compounds and antioxidant activity of new and old apple varieties. **J Journal Agricultural Food Chemistry**. v.56,p. 6520–6530, 2008.
- WOLFE, K.L.; LIU, R.H. Apple peels as a value-added food ingredient. **Journal Agricultural Food Chemistry**; v.51, p.1676–83. 2003.
- WU, J., GAO, H., ZHAO, L., LIAO, X., CHEN, F., WANG, Z., HU, X. Chemical compositional characterization of some apple cultivars. **Food Chemistry**. v.103, n. 1, p. 88-93, 2007.
- XIAO JB, HOGGER P. Dietary polyphenols and type 2 diabetes: current insights and future perspectives. **Current Medicinal Chemistry**. v. 22, p.23–38, 2015.
- XIE, Y.; YANG, W.; TANG, F.; CHEN, X.; REN, L. Antibacterial activities of flavonoids: structure-activity relationship and mechanism. **Current Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 1, p. 132-49, 2015.
- XU Y. et al. Variation in phenolic compounds and antioxidant activity in apple seeds of seven cultivars. **Saudi Journal of Biological Sciences** v. 23, n. 3, p. 379-388, 2016.
- YAN, J.; ZHANG, G.; PAN, J.; WANG, H. α -Glicosidase inhibition by luteolin: kinetics, interaction and molecular docking. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.64, p.213-23, 2014.
- YANEZ, J.; VICENTE, V.; ALCARAZ, M.; CASTILLO, J.; BENAVENTE-GARSIA, O.; CANTERAS, M.; TERUEL, J. Cytotoxicity and antiproliferative activities of several phenolic compounds against three melanocytes cell lines: relationship between structure and activity. **Nutrition and Cancer**. v.49, p.191–199, 2004.
- YILMAZER-MUSA, M. et al. Grape seed and tea extracts and catechin 3-gallates are potent inhibitors of α -amylase and α -glucosidase activity. **Journal of agricultural and Food Chemistry**. v. 60, n.36, p. 8924-9, 2012.
- YING, X.U.; MINGTAO, F.; JUNJIAN, R.; TINGJING Z.; HUIYE, S.; MEI , S.;ZHE , Z.; HAIYAN, Z. Variation in phenolic compounds and antioxidant activity in apple seeds of seven cultivars. **Saudi Journal of Biological Sciences**. v. 23, n. 3, p. 379-388, 2016.
- YOONA KIM, JENNIFER B. KEOGH, AND PETER M. CLIFTON. Polyphenols and Glycemic Control. **Nutrients**. V. 8, n. 1, p. 17. Jan 2016.
- YUE, T. BAI, X.; ZHANG, H.; YUAN, Y. Fractionation and anti-inflammatory effects of polyphenol-enriched extracts from apple pomace. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, v. 7, n.1, 2012.
- YURI, J.A.; NEIRA, A.; MALDONADO, F.; QUILODRÁN, A.; SIMEONE, D.; RAZMILIC, I.; PALOMO, I. Total phenol and quercetin content and antioxidant activity in apples in

response to thermal, light stress and to organic management. **Journal of Applied Botany and Food Quality**, v. 87, p. 131 – 138, 2014.

ZARDO, D. M., SILVA, K. M., GUYOT, S.; NOGUEIRA, A. Phenolic profile and antioxidant capacity of the principal apples produced in Brazil. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.64, n. 5, p. 611–620, 2013.

ZBYTEK, B.; CARLSON, J. A.; GRANESE, J.; ROSS, J.; MIHM, M.; SLOMINSKI, A., Current concepts of metastasis in melanoma. **Expert Review of Dermatology**. v. 3 n.5, p. 569-585, 2008.

ZENDJABIL, M. Biological diagnosis of diabetes mellitus, **Current Research in Translational Medicine**, v.64 p. 49e52, 2016.

ZESSNER, H. et al. Fractionation of polyphenol-enriched apple juice extracts to identify constituents with cancer chemopreventive potential. **Molecular Nutrition & Food Research**. v. 52, p. S28 – S44, 2008.

ZHANG B, DENG Z, RAMDATH DD, TANG H, CHEN PX, LIU R. Phenolic profiles of 20 Canadian lentil cultivars and their contribution to antioxidant activity and inhibitory effects on α -glucosidase and pancreatic lipase. **Food Chemistry**. v.172, p. 862–72, 2015.

ZHANG, H.; TSAO, R. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. **Current Opinion in Food Science**. v. 8, p. 33-42, 2016.

ZHANG, W. et al. Galangin induces B16F10 melanoma cell apoptosis via mitochondrial pathway and sustained activation of p38 MAPK. **Cytotechnology**. v.65, n.3 ,p. 447-55, 2012.

ZHANG, X.Z.; SATHITSUKSANO, N.; ZHU, Z.G. One-step production of lactate from cellulose as the sole carbon source without any other organic nutrient by recombinant cellulolytic *Bacillus subtilis*. **Metabolic Engineering**, v. 13, p. 364–372, 2011.

ZHAO, B.; HE, H.H. Recent advances in the prevention and treatment of pele cancer using photodynamic therapy. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v.10, p. 1797–809, 2010.