



**UNIVERSIDADE DE ÉVORA**

**ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

# **Propriedades antioxidantes e de conservação de maçã**

**Influência da data de colheita em diferentes cultivares oriundas de pomares da Beira Alta, Portugal**

**Juliana Filipa Augusto Agostinho**

Orientação: Prof<sup>a</sup> Isabel Alves-Pereira

Prof Rui Ferreira

**Mestrado em Bioquímica**

Dissertação

**Évora, 2013**



**UNIVERSIDADE DE ÉVORA**

**ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

# **Propriedades antioxidantes e de conservação de maçã**

**Influência da data de colheita em diferentes cultivares  
oriundas de pomares da Beira Alta, Portugal**

**Juliana Filipa Augusto Agostinho**

Orientação: Prof<sup>a</sup> Isabel Alves-Pereira

Prof Rui Ferreira

**Mestrado em Bioquímica**

Dissertação

**Évora, 2013**



## Agradecimentos

A elaboração deste trabalho não teria sido possível sem a colaboração, estímulo e empenho de diversas pessoas. Gostaria, por este facto, de expressar toda a minha gratidão e apreço a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para que mais uma etapa se tornasse realidade. A todos quero manifestar os meus sinceros agradecimentos.

Aos meus orientadores, Prof<sup>a</sup> Isabel Ferreira e Prof. Rui Ferreira, pela orientação e ensinamentos que me transmitiram ao longo destes anos, assim como paciência e apoio. Obrigada por ajudarem a construir o meu percurso científico. Nunca vou esquecer e serei sempre grata.

Ao ICAAM (Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas), pelo financiamento e pela utilização do espectrómetro de fluorescência, que contribuíram para a concretização deste projeto;

Ao Departamento de Química, Universidade de Évora, pelas facilidades proporcionadas à realização deste estudo;

Aos meus pais, por me darem a oportunidade de concluir mais uma etapa da minha vida. Sem eles não seria possível. Também deixar um beijo enorme ao meu irmão Ruben.

Ao meu namorado Victor que é o meu suporte há 4 anos. Obrigada!

À Marta Candeias e à Joana Capela, companheiras de dias de trabalho no laboratório. Obrigada pela vossa amizade, pelas nossas conversas e eterna boa disposição.

Filipa Velhinho e Cátia Relvas, amizade recente mas que veio para ficar.

A todas as amigas que fiz em Évora, amigas de coração que agora estão longe, obrigada por tudo!



# Índice geral

Agradecimentos .....	i
Índice geral .....	iii
Índice de figuras.....	v
Índice de quadros .....	vii
Abreviaturas e nomenclatura de enzimas .....	ix
Resumo .....	xi
Abstrat .....	xiii
1. Fundamento Teórico .....	1
<b>1.1 <i>Malus domestica</i> Borkh na região da Beira-Alta .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Componentes nutritivos e funcionais de <i>Malus domestica</i> .....</b>	<b>2</b>
1.2.1. Vitaminas .....	2
1.2.2. Metabolismo glicídico .....	3
1.2.3. Compostos fenólicos .....	5
<b>1.3. Espécies reativas de oxigénio e stress oxidativo .....</b>	<b>6</b>
<b>1.4. Sistemas antioxidantes de eucariotas .....</b>	<b>7</b>
<b>1.5 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> – modelo biológico para estudos de stress .....</b>	<b>10</b>
<b>1.6. Vanádio um agente oxidante .....</b>	<b>11</b>
2. Problemática e objetivos.....	13
<b>2.1. Problemática .....</b>	<b>13</b>
<b>2.2. Objetivo Geral .....</b>	<b>14</b>
<b>2.3. Objetivos específicos .....</b>	<b>14</b>
3. Metodologia .....	17
<b>3.1 Estratégia .....</b>	<b>17</b>
<b>3.2 Procedimento experimental .....</b>	<b>19</b>
3.2.1. Cultivares de <i>Malus domestica</i> .....	19
3.2.2. Colheita e preparação dos frutos para análise.....	20
3.2.3. Determinação de conteúdos.....	20
3.2.3.1. Tiamina .....	20
3.2.3.2. Riboflavina .....	20
3.2.3.3. Glúcidos totais .....	21
3.2.3.4. Glúcidos redutores .....	21
3.2.3.5. Proteína .....	22

3.2.3.6. Polifenóis totais.....	22
3.2.3.7. Capacidade antioxidante pelo método do DPPH .....	23
3.2.3.8. Capacidade antioxidante pelo método do FRAP .....	23
3.2.3.9. Ascorbato .....	24
3.2.3.10. GSH e GSSG .....	24
3.2.3.11. Prolina .....	25
3.2.3.12. ROS .....	25
3.2.3.13. MDA.....	25
3.2.4. Determinação de atividade enzimática.....	26
3.2.4.1. Sorbitol desidrogenase.....	26
3.2.4.2. Prolina desidrogenase .....	26
3.2.4.3. Peroxidase .....	27
3.2.4.4. Glutatio peroxidase .....	27
3.2.4.5. Superóxido dismutase .....	28
3.2.4.6. Glucose-6-fosfato desidrogenase.....	28
3.2.4.7. Fosfatase alcalina .....	29
3.2.4.8. Glutatio redutase .....	29
3.2.4.9. Catalase .....	30
3.2.5. Atividade biológica em <i>Sacharomyces cerevisiae</i> .....	30
3.2.5.1. Cultura de microrganismos .....	30
3.2.5.2. Determinação do peso seco .....	31
3.2.5.3. Viabilidade celular .....	31
3.2.5.4. Preparação das frações pós-12000 g .....	31
<b>3.3 Diagrama do Trabalho .....</b>	<b>33</b>
<b>3.4 Material .....</b>	<b>34</b>
<b>3.5 Equipamento.....</b>	<b>34</b>
<b>3.6 Reagentes.....</b>	<b>34</b>
<b>4. Resultados e Discussão.....</b>	<b>37</b>
<b>4.1 Valor nutritivo de <i>Malus domestica</i> em diferentes tempos de colheita.....</b>	<b>37</b>
<b>4.2 Capacidade antioxidante de <i>Malus domestica</i> em diferentes tempos de colheita.....</b>	<b>41</b>
4.2.1 Polpa .....	41
4.2.2 Pele.....	46
<b>4.3 Atividade biológica de extrato aquoso de polpa de <i>Malus domestica</i> .....</b>	<b>48</b>
<b>5. Conclusões.....</b>	<b>53</b>
<b>6. Referências bibliográficas .....</b>	<b>55</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>61</b>



## Índice de figuras

<b>Figura 1.1.</b> Demarcação geográfica do cultivo da variedade Bravo de Esmolfe, DOP (A) e das variedades Starking e Golden Delicious (B) IGP .....	1
<b>Figura 1.2.</b> Fluxo de carbono no metabolismo glicídico na macieira (adaptado de Teo (2006) e Li (2012) Sor (sorbitol), Sac (sacarose), S6P (sorbitol-6-fosfato), S6PDH (sorbitol-6-fosfato desidrogenase), SDH (sorbitol desidrogenase), Fru (frutose), Gli (glicose), NIN (invertases neutras), VIN (invertases do vacúolo), SS (metabolismo e quebra amido), Hex (hexose); .....	4
<b>Figura 1.3.</b> Origem metabólica de compostos fenólicos da macieira .....	6
<b>Figura 4.1.1.</b> Conteúdo em tiamina na polpa (A) e na pele (B) de maçã Bravo de Esmolfe, <i>Starking</i> e <i>Golden Delicious</i> em dois tempos de colheita.....	38
<b>Figura 4.1.2.</b> Conteúdo em riboflavina na polpa (A) e na pele (B) de maçã Bravo de Esmolfe, <i>Starking</i> e <i>Golden Delicious</i> em dois tempos de colheita.....	39
<b>Figura 4.1.3.</b> Conteúdo em glúcidos totais na polpa (A) e pele (C) e redutores na polpa (B) e pele (D) de maçã Bravo de Esmolfe, <i>Starking</i> e <i>Golden Delicious</i> em dois tempos de colheita. ....	40
<b>Figura 4.1.4.</b> Atividade sorbitol desidrogenase de maçã Bravo de Esmolfe, <i>Starking</i> e <i>Golden Delicious</i> em dois tempos de colheita. ....	40
<b>Figura 4.2.1.</b> Conteúdo em polifenóis totais no extrato aquoso (A) etanólico (B) de polpa de maçã Bravo de Esmolfe, <i>Starking</i> e <i>Golden Delicious</i> em dois tempos de colheita. ....	42
<b>Figura 4.2.2</b> Capacidade antioxidante medida pelo DPPH no extrato aquoso (A) etanólico (B) de polpa de maçã Bravo de Esmolfe, <i>Starking</i> e <i>Golden Delicious</i> em dois tempos de colheita. ....	42
<b>Figura 4.2.3</b> Capacidade antioxidante medida pelo FRAP (A) e pelo ascorbato (B) no extrato aquoso de polpa de maçã Bravo de Esmolfe, <i>Starking</i> e <i>Golden Delicious</i> em dois tempos de colheita.....	43
<b>Figura 4.2.4.</b> Conteúdo em glutationo (A), dissulfureto de glutationo (B), tióis totais não proteicos (C) e razão GSH/GSSG (D) no extrato aquoso de polpa de maçã Bravo de Esmolfe, <i>Starking</i> e <i>Golden Delicious</i> em dois tempos de colheita. ....	44
<b>Figura 4.2.5</b> Conteúdo em prolina (A) e prolina desidrogenase (B) no extrato aquoso de polpa de maçã Bravo de Esmolfe, <i>Starking</i> e <i>Golden Delicious</i> em dois tempos de colheita. ....	45
<b>Figura 4.2.6</b> Atividade catalítica de enzimas antioxidantes POD (A), GPx (B), SOD (C) e G6PD (D) no extrato aquoso de polpa de maçã Bravo de Esmolfe, <i>Starking</i> e <i>Golden Delicious</i> em dois tempos de colheita. ....	46
<b>Figura 4.2.7</b> Conteúdo em polifenóis totais no extrato aquoso (A) etanólico (B) de pele de maçã Bravo de Esmolfe, <i>Starking</i> e <i>Golden Delicious</i> em dois tempos de colheita. ....	46
<b>Figura 4.2.8</b> Capacidade antioxidante medida pelo DPPH no extrato aquoso (A) etanólico (B) de pele de maçã Bravo de Esmolfe, <i>Starking</i> e <i>Golden Delicious</i> em diferentes tempos de colheita. ....	47
<b>Figura 4.2.9</b> Capacidade antioxidante medida pelo FRAP (A) e pelo ascorbato (B) no extrato aquoso de pele de maçã Bravo de Esmolfe, <i>Starking</i> e <i>Golden Delicious</i> em diferentes tempos de colheita.....	47
<b>Figura 4.3.1</b> Peso seco (A), cfu (B) e atividade ALP (C) de células de <i>S. cerevisiae</i> BY4741, crescidas em meio YEPD na ausência e na presença de pentóxido de vanádio (2 mM), assim como na presença de pentóxido de vanádio (2 mM) e extrato de maçã (5 %). ....	49
<b>Figura 4.3.2</b> Conteúdo em glutationo (A), dissulfureto de glutationo (B), tióis totais não proteicos (C) e razão GSH/GSSG (D) de células de <i>S. cerevisiae</i> BY4741, crescidas em meio YEPD na ausência e na presença de pentóxido de vanádio (2 mM), pentóxido de vanádio (2 mM) e extrato de maçã (5 %). ....	50
<b>Figura 4.3.3</b> Atividade catalítica de enzimas antioxidantes GR (A), GPx (B), CAT T (C) e CAT A (D) de células de <i>S. cerevisiae</i> BY4741, crescidas em meio YEPD na ausência e na presença de pentóxido de vanádio (2 mM), ou pentóxido de vanádio (2 mM) e extrato de maçã (5 %). ....	51
<b>Figura 4.3.4</b> Conteúdo em ROS (A) e MDA (B) de células de <i>S. cerevisiae</i> BY4741, crescidas em meio YEPD na ausência e na presença de pentóxido de vanádio (2 mM), assim como na presença de pentóxido de vanádio (2 mM) e extrato de maçã (5 %). ....	51

<b>Figura A1</b> – Representação gráfica da curva de calibração para a quantificação de tiamina, construída a partir da leitura da potência de fluorescência de soluções padrão (0-0,104 µg/mL).....	63
<b>Figura A2</b> – Representação gráfica da curva de calibração para a quantificação de riboflavina, construída a partir da leitura da potência de fluorescência de soluções padrão (0-5 µg/mL).....	63
<b>Figura A3</b> – Representação gráfica da curva de calibração na quantificação de glícidos totais, construída a partir da leitura da absorvência de soluções padrão de glucose (0-10 mg/mL).....	63
<b>Figura A4</b> – Representação gráfica da curva de calibração na quantificação de glícidos redutores, construída a partir da leitura da absorvência de soluções padrão de glucose (0-2 mg/mL).....	64
<b>Figura A5</b> - Representação gráfica da curva de calibração utilizada na quantificação de proteína, construída a partir da leitura de absorvência de soluções padrão de BSA (0-200 µg/mL).....	64
<b>Figura A6</b> - Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de polifenói, construída a partir da leitura de absorvência de soluções padrão de ácido gálico (0-100 mg/L).....	64
<b>Figura A7</b> – Representação gráfica da curva de calibração para a quantificação da capacidade antioxidante pelo método do DPPH construída a partir da leitura de absorvência de soluções padrão de ácido gálico (0-200 mg/L).....	65
<b>Figura A8</b> – Representação gráfica da curva de calibração para a quantificação da capacidade antioxidante pelo método do FRAP construída a partir da leitura de absorvência de soluções padrão de trolox (0-16mg/mL).....	65
<b>Figura A9</b> – Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de ascorbato, construída a partir da leitura de absorvência de soluções padrão de ascorbato (0-30 mg/L).....	65
<b>Figura A10</b> – Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de GSH, construída a partir da leitura fluorimétrica de soluções padrão de GSH (0-100 µM).....	66
<b>Figura A11</b> – Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de GSSG, construída a partir da leitura fluorimétrica de soluções padrão de GSSG (0-24µM).....	66
<b>Figura A12</b> – Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de prolina, construída a partir da leitura de absorvência de soluções padrão de ascorbato (0-12 mg/L).....	66
<b>Figura A13</b> – Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de ROS (0-400 mM), construída a partir da leitura fluorimétrica de soluções padrão de peróxido de hidrogénio.....	67
<b>Figura A14</b> – Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de MDA (0-100 µM), construída a partir da leitura fluorimétrica de soluções padrão de MDA.....	67
<b>Figura A15</b> – Representação gráfica da curva de reação do enzima sorbitol desidrogenase de maçã <i>Starking</i> no primeiro tempo de colheita.....	67
<b>Figura A16</b> – Representação gráfica da curva de reação do enzima sorbitol desidrogenase de maçã <i>Bravo</i> de Esmolfe no primeiro tempo de colheita.....	68
<b>Figura A17</b> – Representação gráfica da curva de reação do enzima prolina desidrogenase de maçã <i>Golden Delicious</i> no segundo tempo de colheita.....	68
<b>Figura A18</b> – Representação gráfica da curva de reação do enzima prolina desidrogenase de maçã <i>Bravo</i> de Esmolfe no primeiro tempo de colheita.....	68
<b>Figura A19</b> – Representação gráfica da curva de reação do enzima peroxidase de maçã <i>Starking</i> no primeiro tempo de colheita.....	69
<b>Figura A20</b> – Representação gráfica da curva de reação do enzima peroxidase de maçã <i>Bravo</i> de Esmolfe no primeiro tempo de colheita.....	69
<b>Figura A21</b> – Representação gráfica da curva de reação do enzima glutationo peroxidase de maçã <i>Bravo</i> de Esmolfe no primeiro tempo de colheita.....	69
<b>Figura A22</b> – Representação gráfica da curva de reação do enzima glutationo peroxidase de maçã <i>Starking</i> no primeiro tempo de colheita.....	70
<b>Figura A23</b> – Representação gráfica da curva de reação do enzima superóxido dismutase de maçã <i>Bravo</i> de Esmolfe no segundo tempo de colheita.....	70
<b>Figura A24</b> – Representação gráfica da curva de reação do enzima superóxido dismutase de maçã <i>Starking</i> no segundo tempo de colheita.....	70

<b>Figura A25</b> – Representação gráfica da curva de reação do enzima glucose-6-fosfato desidrogenase de maçã Bravo de Esmolfe no segundo tempo de colheita. ....	71
<b>Figura A26</b> – Representação gráfica da curva de reação do enzima glucose-6-fosfato desidrogenase de maçã <i>Starking</i> no segundo tempo de colheita. ....	71
<b>Figura A27</b> – Representação gráfica da curva de reação do enzima fosfatase alcalina de sobrenadante pós-12000 g de <i>S. cerevisiae</i> BY4741, crescidas em meio YEPD, na presença de pentóxido de vanádio (2,0mM). ....	71
<b>Figura A28</b> – Representação gráfica da curva de reação do enzima fosfatase alcalina de sobrenadante pós-12000 g de <i>S. cerevisiae</i> BY4741, crescidas em meio YEPD, na presença de pentóxido de vanádio (2,0mM) e extrato de maçã Bravo de Esmolfe (5%). ....	72
<b>Figura A29</b> – Representação gráfica da curva de reação do enzima glutatióno redutase pós-12000 g de <i>S. cerevisiae</i> BY4741, crescidas em meio YEPD, na presença de pentóxido de vanádio (2,0mM) e extrato de maçã <i>Starking</i> (5%). ....	72
<b>Figura A30</b> – Representação gráfica da curva de reação do enzima glutatióno redutase de sobrenadante pós-12000 g de <i>S. cerevisiae</i> BY4741, crescidas em meio YEPD, na presença de pentóxido de vanádio (2,0mM) e extrato de maçã <i>Golden Delicious</i> (5%). ....	72
<b>Figura A31</b> – Representação gráfica da curva de reação do enzima catalase T de sobrenadante pós-12000 g de <i>S. cerevisiae</i> BY4741, crescidas em meio YEPD, na presença de pentóxido de vanádio (2,0mM) e extrato de maçã <i>Starking</i> (5%). ....	73
<b>Figura A32</b> – Representação gráfica da curva de reação do enzima catalase T de sobrenadante pós-12000 g de <i>S. cerevisiae</i> BY4741, crescidas em meio YEPD, na presença de pentóxido de vanádio (2,0mM) e extrato de maçã Bravo de Esmolfe (5%). ....	73
<b>Figura A33</b> – Representação gráfica da curva de reação do enzima catalase A de sedimento pós-12000 g de <i>S. cerevisiae</i> BY4741, crescidas em meio YEPD, na presença de pentóxido de vanádio (2,0mM) e extrato de maçã <i>Starking</i> (5%). ....	73
<b>Figura A34</b> – Representação gráfica da curva de reação do catalase A do sedimento pós-12000 g de <i>S. cerevisiae</i> BY4741, crescidas em meio YEPD, na presença de pentóxido de vanádio (2,0mM) e extrato de maçã Bravo de Esmolfe (5%). ....	74

## Índice de quadros

<b>Quadro 3.1.</b> Variedades de <i>Malus domestica</i> Bokh utilizadas no estudo. ....	19
<b>Quadro A1.</b> Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”), resultados obtidos por análise direta do extrato.....	75
<b>Quadro A2.</b> Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”), resultados obtidos nos ensaios com <i>S. cerevisiae</i> .....	77



## Abreviaturas e nomenclatura de enzimas

ALP	Fosfatase alcalina (EC 3.1.3.1)
CAT T	Catalase citosolica (EC 1.11.1.6)
CAT A	Catalase peroxissomal (EC 1.11.1.6)
cfu	Unidades formadoras de colónias
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
DOP	Denominação de Origem Protegida
DPPH*	Radical 2,2- difenil-1- picrilhidrazilo
FRAP	Capacidade antioxidante redutora do ferro, do inglês <i>Ferric Redution Antioxidant Power</i>
GR	Glutationo redutase (EC 1.6.4.2)
GRAS	Organismos reconhecidos como seguros, do inglês <i>Generally Regarded As Safe</i> (FDA, USA)
GSH	Glutationo
GSSG	Dissulfureto de glutatióno
GPx	Glutationo peroxidase (EC 1.11.1.9)
G6PD	Glucose 6-fosfato desidrogenase (EC 2.5.1.18)
IGP	Indicação Geográfica Protegida
NEM	n-etilmaleimida
OPT	o-ftalaldeído
PDH	Prolina desidrogenase (EC 1.5.99.8)
POD	Peroxidases (EC 1.11.1.7)
ROS	Espécies reativas de oxigénio, do inglês <i>reactive oxygen species</i>
SDH	Sorbitol desidrogenase (EC 1.1.1.14)
SOD	Superóxido dismutase (EC 1.15.1.1)
TCA	Ácido tricloroacético
TPTZ	(2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina
XOD	Xantina oxidase (EC 1.17.3.2)
YEPD	Extrato de levedura com peptona e glucose, do inglês <i>Yeast Extrat Peptone Dextrose</i>



# Propriedades antioxidantes e de conservação de maçã – influência da data de colheita em diferentes cultivares oriundas de pomares da Beira Alta, Portugal

## Resumo

Os resultados mostraram que os extratos aquoso e etanólico da polpa e pele de maçãs, da variedade Bravo de Esmolfe, da colheita precoce exibiam conteúdo mais elevado em fenóis, ascorbato, glutatióno e prolina, bem como maior capacidade antioxidante estimada pelo DPPH, FRAP e glutatióno, características que lhes conferiu maior valor funcional. Contudo, frutos da colheita tardia desta cultivar exibiram capacidade antioxidante não enzimática semelhante ao das cultivares *Golden Delicious* e *Starking*, compensados por níveis superiores das atividades prolina desidrogenase, peroxidases, glutatióno peroxidase, superóxido dismutase e glucose-6-fosfato desidrogenase, bons marcadores de conservação. Extratos aquosos da polpa de qualquer das cultivares de *Malus domestica* Borkh colhidas no primeiro tempo de colheita, reverteram os efeitos oxidantes do pentóxido de vanádio (2 mM) em *Saccharomyces cerevisiae* BY4741, aumentando a razão glutatióno/dissulfureto de glutatióno e diminuindo o conteúdo em espécies reativas de oxigénio e malonodialdeído.





# Antioxidant and conservation properties of apple - influence of harvest date in different cultivars harvested in orchards of Beira Alta, Portugal

## Abstrat

The results showed that the aqueous and ethanol extracts of the pulp and skin of apples *Bravo Esmolfe* taken for the first harvest time exhibit higher content in phenols, ascorbate, glutathione, and proline, as well as higher antioxidant capacity estimated by DPPH, FRAP and glutathione, features which gave them greater functional value. However, the late harvest fruits of this cultivar exhibited similar non-enzymatic antioxidant power to the Golden Delicious and Starking cultivars, offset by higher levels of proline dehydrogenase, peroxidase, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and glucose-6-phosphate dehydrogenase activities, good conservation markers. Aqueous extrats of the pulp of any of the varieties of *Malus domestica* Borkh taken for the first harvest time, reversed the effects of oxidizing 2 mM vanadium pentoxide in *Saccharomyces cerevisiae* BY4741, increasing the glutathione/glutathione disulfide ratio and decreasing the content in reactive oxygen species and malondialdehyde.



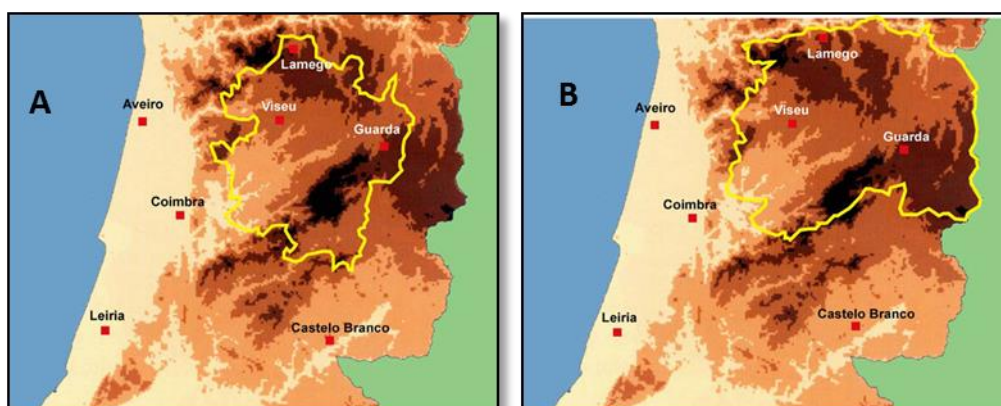
# 1. Fundamento Teórico

## 1.1 *Malus domestica* Borkh na região da Beira-Alta

A macieira, *Malus domestica* Borkh é uma espécie pertencente à sub-família Pomoideae da família Rosaceae domesticada há mais de 2500 anos, cujo fruto, a maçã, contém muitos constituintes benéficos para a saúde humana, tais como compostos fenólicos, glicídios, glicoálcoois, ácidos orgânicos e aminoácidos, metabolitos primários e secundários que determinam a sua qualidade (Zhang, 2010). O fato de a maçã destacar-se entre os frutos, por exibir propriedades medicinais, condicionou a implantação ubíqua da cultura da macieira, bem com o seu consumo em quase todos os países do globo terrestre (Zhang, 2010).

A cultura da macieira como fruteira encontra-se um pouco em todos os continentes devido à sua elevada capacidade de adaptação a diferentes condições de temperatura, existindo variedades com necessidade variável de horas de frio necessárias à sua florescência, tornando possível a existência de pomares desde zonas frias a zonas subtropicais (Lemos, 2009; Barracosa, 2008).

A região Portuguesa da Beira Alta é um exemplo de zona propícia à cultura da macieira, por possuir um microclima variável e diversificado, com invernos rigorosos e verões quentes com forte luminosidade, fatores ambientais que proporcionam o desenvolvimento de frutos ricos em glicídios, com boa consistência da polpa e pigmentação brilhante que os dota de excelente sabor e capacidade de preservação (Lemos, 2009; Ministério da agricultura (b); Dinis, 2007).



**Figura 1.1.** Demarcação geográfica do cultivo da variedade Bravo de Esmolfe, DOP (A) e das variedades Starking e Golden Delicious (B) IGP (adaptado de drapc.min-agricultura.pt)

Esta região geográfica (Fig.1.1) possui atualmente uma cultura massiva e tradicional de maçã, onde está incluída uma IGP-Indicação Geográfica Protegida denominada por “Maçã

da Beira Alta” que abrange variedades como *Golden Delicious*, *Gala*, *Red Delicious*, *Starking*, *Jonagold*, *Granny Smith*, *Jonared* e *Reinetas*, e uma DOP- Denominação de Origem Protegida, denominada “Bravo de Esmolfe”. Esta última, originária da aldeia de Esmolfe e conhecida desde o século XVIII. É suposto que a mesma seja originária de um cruzamento accidental entre duas ou mais variedades ancestrais, ou que tenha origem numa macieira brava que adquiriu, por mutação genética, características únicas e peculiares ao nível do sabor e capacidade antioxidante (Lemos, 2009; Ministério da Agricultura (a); Santos, 2008; Dinis, 2007).

## **1.2 Componentes nutritivos e funcionais de *Malus domestica***

### **1.2.1. Vitaminas**

A maçã, tal como outros frutos é reconhecida como fonte de vitaminas, as quais compreendem um grupo diverso de compostos orgânicos, que são necessários para assegurar o crescimento regular e a manutenção da saúde humana. Possuem composição química e funções biológicas diversas, necessárias para a síntese de cofatores essenciais a grande número de reações metabólicas controladas enzimaticamente. A classificação das vitaminas de acordo com a sua solubilidade permite distinguir as lipossolúveis (A, D, E e K), de estrutura química diversa e solubilidade elevada em solventes orgânicos, das hidrossolúveis como as do complexo B e o ascorbato. As vitaminas lipossolúveis podem armazenar-se na gordura corporal, podendo ser tóxicas quando consumidas em excesso. Por outro lado, as vitaminas hidrossolúveis, grupo onde se encontram integradas a tiamina e a riboflavina do complexo B, normalmente não se acumulam em quantidade elevada em células e tecidos, fator que torna necessário um fornecimento diário das mesmas (Soares de Arruda, 2013).

A tiamina, ou vitamina B1, é essencial no metabolismo celular primário. É um coenzima que na forma de tiamina pirofosfato está envolvido em reações essenciais ao metabolismo glícídico tal como glicólise, ciclo de Krebs e via das pentoses fosfato (Hamada, 2013; Goyer, 2010). As flavinas, do latim flavus (amarelo), são uma classe de compostos orgânicos com base pteridina cíclica e estrutura do núcleo constituída por um heterociclo tricíclico de isoaloxazina. A riboflavina, ou vitamina B2, assume elevada importância bioquímica pois é o precursor exclusivo de coenzimas como o FMN e o FAD, essenciais ao metabolismo e produção energética animal. Esses cofatores são requeridos para manter o funcionamento adequado de flavoproteínas participando como coenzimas em reações de oxidação-redução essenciais (Petteys, 2010).

O ascorbato, uma vitamina hidrossolúvel essencial para o homem e alguns primatas é sob o ponto de vista estrutural um derivado metabólico da glicose ou da galatose. Pode ser

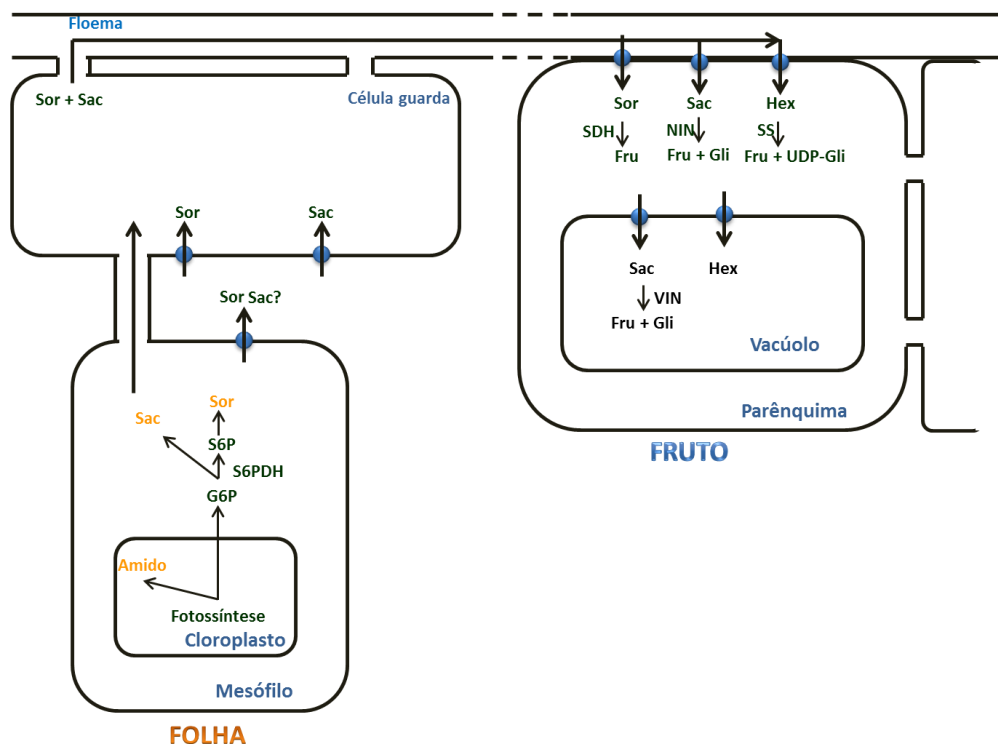
detetada em plantas e na maior parte dos animais que expressem a L-gluconolactona oxidase, enzima que catalisa a conversão do substrato L-gluconolactona em ascorbato (Yoshihara, 2010; Gomez, 2008; Arrigoni, 2002; Banhegyi, 1997). O papel biológico desta vitamina prende-se como a sua capacidade para participar em processos de oxidação-redução podendo, por exemplo, ser oxidada a desidro-ascorbato. Ao participar em processos metabólicos como a hidroxilação e catabolismo de aminoácidos tem-se revelado um excelente antioxidante. A principal fonte de ascorbato para o homem é a dieta rica em alimentos naturais ou conservados, onde existe com abundância (Ahmed, 2009; Gomez, 2008). Contudo, esta molécula parece exercer efeitos fisiológicos dúbios, uma vez que na presença de catiões metálicos divalentes pode comportar-se como oxidante (Jomova, 2010; Takemura, 2010)

Face ao exposto, a determinação do conteúdo vitamínico dos frutos, bem como a influência do tempo de colheita nessa composição tem-se revelado uma ferramenta essencial na determinação do seu valor funcional.

### 1.2.2. Metabolismo glicídico

Os glicídidos são produtos diretos da atividade fotossintética que fornecem energia para o crescimento e desenvolvimento da planta. Além disso, glicídidos como a sacarose, a glicose e a frutose são conhecidos por também atuarem como moléculas de sinalização na regulação da expressão de genes chave envolvidos no desenvolvimento, crescimento e mecanismos de defesa da planta. Os glicídidos também são fundamentais para a qualidade e produtividade das culturas. Em frutos como a maçã, a acumulação de glicídidos durante o desenvolvimento do fruto determina em grande parte a sua doçura na colheita (Li, 2012; Sivaci, 2006). Consequentemente, outra vertente deste trabalho procurou estimar a quantidade de glicídidos redutores e não redutores acumulados nos frutos analisados e sua dependência do tempo de colheita. A Fig. 1.2 descreve o fluxo de carbono no metabolismo glicídico da macieira. Assim, ao nível das células do mesófilo da folha formam-se como produtos primários da fotossíntese amido, sacarose (sac) e sorbitol (sorb), o glicídido mais abundante na família das rosáceas (60-70% dos glicídidos formados pela fotossíntese) cuja síntese envolve o enzima sorbitol-6-fosfato desidrogenase (S6PDH). O sorbitol e a sacarose são então transferidos para as células guarda por difusão facilitada ou por transportadores transmembranares específicos, onde em associação são transferidos para o floema que os leva às células do parênquima do fruto, onde o sorbitol é convertido em frutose (Fru) pelo enzima sorbitol desidrogenase (SDH), um dos que foi eleito neste estudo. No fruto, a sacarose pode então ser convertida em frutose e glicose por invertases (NIN, VIN). Alguns autores admitem que a inibição da S6PDH, influenciada pela taxa de fotossíntese pode ser

correlacionada com o conteúdo em sorbitol das células do mesófilo foliar e do parênquima frutal, bem como com o decréscimo da atividade sorbitol desidrogenase (SDH) e conteúdo em frutose do fruto. Deste modo, frutos com menor atividade SDH são tidos como portadores maioritários de glicose e sacarose, razão pela qual alguns produtores atribuem-lhes sabor mais adocicado e conseqüentemente menos ácido. Por esse motivo a atividade SDH pode ser tomada como marcador adequado da qualidade do fruto (Li, 2012; Teo, 2006).



**Figura 1.2.** Fluxo de carbono no metabolismo glicídico na maçã (adaptado de Teo (2006) e Li (2012) Sor (sorbitol), Sac (sacarose), S6P (sorbitol-6-fosfato), S6PDH (sorbitol-6-fosfato desidrogenase), SDH (sorbitol desidrogenase), Fru (frutose), Gli (glicose), NIN (invertases neutras), VIN (invertases do vacúolo), SS (metabolismo e quebra amido), Hex (hexose);

Comparativamente com plantas modelo que sintetizam e metabolizam maioritariamente sacarose, a maçã exibe um metabolismo glicídico único, onde mais de 80% do fluxo total de carbono passa pela frutose, onde quase todo o sorbitol citoplasmático é convertido em frutose pelo SDH, após ser libertado nas células do parênquima pelos complexos SE-CC. Por outro lado, metade da sacarose é ainda convertida em frutose após transporte direto para as células do parênquima por transportadores de sacarose (SUC ou SUT) da membrana plasmática, ou ainda convertida em glicose e frutose por invertases que podem ser posteriormente transportados para o vacúolo por transportadores de hexoses. Deste modo, a frutose acumula-se na maçã em níveis muito superiores aos de glicose (Li, 2012).

### 1.2.3. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos presentes nos tecidos vegetais estão intimamente associados à qualidade sensorial e nutricional dos alimentos, contribuindo direta ou indiretamente para o seu aroma e sabor. Contudo, estes compostos são maioritariamente reconhecidos pela sua ação antioxidante nos alimentos e em sistemas biológicos, onde são preferencialmente oxidados, poupando assim outros nutrientes, células e tecidos (Ceyman, 2012; Imeh, 2002). O poder antioxidante deste tipo de compostos deve-se à deslocalização eletrónica dos anéis benzénico e benzo-pirano que bloqueiam reações radicalares deletérias para a célula viva, ao capturarem com eficácia eletrões desemparelhados das ROS e convertendo-se em radicais orgânicos que transitam posteriormente para uma estrutura estável (Soobrattee, 2005). Este tipo de compostos, como a catequina possui uma origem metabólica mista, a via do chiquimato e a via do mevalonato que se encontra ilustrada de forma sucinta na Fig. 1.3, que contribuem para gerar uma estrutura com quinze átomos de carbono designada chalcona, o precursor inicial dos fenóis.

O teor e o perfil de fenóis da maçã é fortemente determinado pelo tipo de cultivar, mas também depende do tecido considerado, do estado de maturação, região e condições pedoclimáticas (Slatnar, 2012; Carbone, 2011; Stracke, 2009; Alberto, 2006). A literatura revela ainda que a concentração e composição de compostos fenólicos é, por vezes, distinta na pele e na polpa de maçã (Zhang, 2010; Wolf, 2003). Assim, as quatro classes de polifenóis que predominam nesses frutos são flavan-3-óis, ácidos fenólicos, dihidrochalconas e flavonóis (Ceymann, 2012).

O teor de alguns compostos fenólicos tais como o ácido clorogénico, a catequina, a epicatequina, a procianidina B1 ou B2 são mais elevados na polpa de maçã, quer no estágio inicial de desenvolvimento quer antes da colheita (Tenore, 2013; Zhang, 2010).

A polpa possui também ácido cafeico, antocianinas e dihidrochalconas, sendo a floretina e a floridizina exclusivas na maçã (Tenore, 2013; Alberto, 2006). A casca possui todos os compostos fenólicos mencionados anteriormente, bem como flavonóides que não estão presentes na polpa, tais como glicósidos de quercetina e de cianidina (Alberto, 2006; Wolf, 2003). Nos estádios iniciais, a pele de maçã contém níveis elevados de ácidos hidroxicinâmicos, flavonóides e proantocianidinas, que se assume desempenharem um papel importante na defesa contra agentes patogénicos, dissuasão herbívora e proteção contra radiação ultra-violeta (Slatnar, 2012). Durante a maturação, a concentração destes compostos diminui e, em algumas cultivares de macieira, acumulam-se antocianinas (Slatnar, 2012; Zhang, 2010).

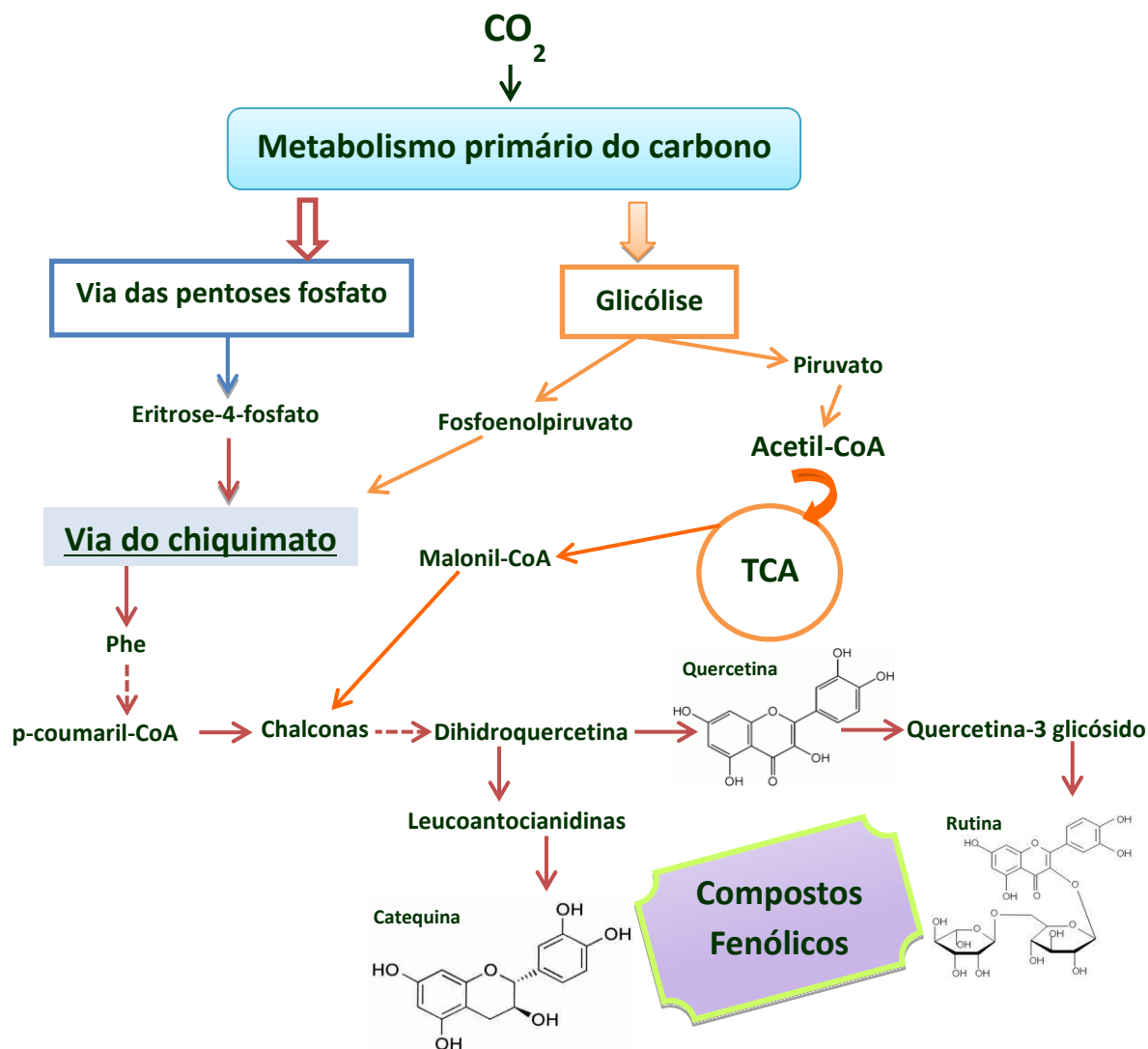


Figura 1.3. Origem metabólica de compostos fenólicos da maçeira (adaptado de Awad, 2001)

### 1.3. Espécies reativas de oxigénio e stress oxidativo

As espécies reativas de oxigénio são moléculas de pequena dimensão e de curto tempo de meia-vida que desempenham um papel relevante em vias de sinalização que assistem à proliferação e diferenciação celular, bem como à expressão génica (Sieprath, 2012). Quando ocorre um desequilíbrio entre a produção de ROS e a capacidade do sistema biológico para desintoxicar prontamente os intermediários reativos gerados e/ou reparar os danos celulares subsequentes, a célula entra em *stress oxidativo* (Chervona, 2012). Um excesso crónico de ROS pode então danificar componentes celulares. Embora as ROS possam afetar qualquer componente da célula, geralmente reagem com a primeira estrutura que encontram, frequentemente proteínas, lípidos ou ácidos nucleicos. Quanto mais amplo for o período de stress oxidativo, mais intensas são as consequências dos seus



efeitos. No entanto, a oxidação moderada por pulsos de ROS pode desencadear a apoptose, enquanto que a exposição crónica a condições de stress oxidativo induzem morte celular por necrose (Rosenfeldt, 2013).

As ROS podem ter diversas origens, como ativação enzimática divergente de citocromo C oxidase, NADPH oxidase ou xantina oxidase. Por outro lado, em processos metabólicos basais, o mitocôndrio desempenha um papel crucial no metabolismo energético, assegurando a disponibilização de energia essencial às funções celulares por processos que envolvem transferência de eletrões cuja interrupção ou ativação podem despoletar a formação de ROS (Rosenfeldt, 2013).

Em plantas, diversas perturbações ambientais como intensidade de luz elevada, stress hídrico, térmico e salino, bem como exposição ao ozono, a herbicidas, metais pesados, organismos patogénicos, poluentes atmosféricos e toxinas induzem a produção excessiva de ROS (Karuppanapandian, 2011).

As ROS também podem causar danos extensos e graves nas estruturas lipídicas. Por exemplo, o radical hidroxilo ao remover protões dos resíduos acilo leva à formação de radicais acilo iniciadores da peroxidação lipídica. Esse grupo radicalar, na presença de O<sub>2</sub> conduz à formação de radicais lipoperoxilo (LOO<sup>•</sup>), dando corpo à denominada fase de propagação da peroxidação lipídica. Os radicais peroxilo, então formados, reagem com outras moléculas vizinhas, removendo-lhes um protão, com formação de lipoperoxidos (LOOH) e novo radical acilo, ao longo da denominada fase de terminação da peroxidação lipídica. Os lipoperoxidos podem ainda participar em outros passos reacionais que levam à formação de aldeídos como o malonodialdeído (MDA) com propriedades genotóxicas, por reagir com ácidos nucleicos e aminoácidos e conseqüentemente propagar danos inicialmente lipídicos a outras classes de moléculas (Franco, 2009).

## **1.4.Sistemas antioxidantes de eucariotas**

Os organismos aeróbios desenvolveram mecanismos de defesa não-enzimáticos e enzimáticos contra os efeitos deletérios dos radicais livres e de outras espécies reativas.

Os principais agentes antioxidantes não-enzimáticos podem ser vitaminas lipossolúveis como A e E ou vitaminas hidrossolúveis como a C e as do complexo B, o β-caroteno e diversos oligoelementos como o zinco, cobre, selénio e magnésio. Existe ainda uma série de outros antioxidantes não-enzimáticos que participam na defesa contra as espécies reativas de oxigénio nos sistemas biológicos como, por exemplo, o glutatono, compostos fenólicos de origem vegetal e aminoácidos como a prolina (Bonatto, 2007; Cipak, 2007).

Os mecanismos antioxidantes não enzimáticos presentes na célula viva, envolvem estruturas químicas de baixo peso molecular como o tripéptido glutatono, cujo grupo

sulfidrilo é capaz de capturar diretamente espécies reativas de oxigénio. O glutatono, bem como o seu derivado oxidado dissulfureto de glutatono, estão deste modo fortemente implicados na estabilização do saudável ambiente redutor intracelular.

A prolina, outro composto de baixo peso molecular com propriedades antioxidantes, possui um grupo amina secundário que lhe confere propriedades singulares entre os aminoácidos proteinogénicos. Por esse motivo, a prolina desempenha um papel crucial no metabolismo celular quer como componente proteico quer como aminoácido livre. A sua estrutura cíclica limita a flexibilidade conformacional das cadeias peptídicas em que participa protegendo-as contra a desnaturação, estabilizando a estrutura membranar por interação com os fosfolípidos, capturando o radical hidroxilo ou servindo como fonte energética de azoto (Cecchini, 2011; Lehman, 2010). As espécies vegetais acumulam prolina quando respondem a um amplo leque de pressões ambientais, como privação de água, salinidade, flutuações de temperatura, infeções por agentes patogénicos, exposição a metais pesados, anaerobiose, carência de nutrientes, poluição atmosférica e irradiação UV (Stein, 2011, Verslues, 2010). Assim, alguns investigadores admitem que níveis elevados de prolina contribuem para tolerância a diversas situações de stress ambiental que dependem da capacidade da prolina para mediar ajuste osmótico, eliminar radicais livres, estabilizar estruturas subcelulares, e suprir o potencial químico necessário para a recuperação do estado de stress (Stein, 2011).

A degradação de prolina nas plantas ocorre nos mitocôndrios encontrando-se espacialmente separada da via biossintética. O catabolismo da prolina tem como primeiro passo regulador da conversão de prolina em glutamato, a oxidação da prolina a D1-pirrolina-5-carboxilato (P5C) pelo flavoenzima prolina desidrogenase (ProDH), onde o coenzima dinucleótido de flavina e adenina (FAD) é utilizado para transferir eletrões para a cadeia respiratória (Cecchini, 2011; Lehman, 2010).

A resposta antioxidante pode manifestar-se por diferentes formas, dependendo muitas vezes da fonte de ROS. Deste modo, nos últimos anos têm surgido diversos métodos para estimar a capacidade antioxidante relacionada com componentes químicos dos alimentos, destacando-se, entre eles, o FRAP que mede o poder do Ferro (Prior, 2005). Este método foi originalmente desenvolvido por Benzie and Strain (1996) para medir o poder antioxidante do plasma sanguíneo, mas rapidamente a aplicação deste expandiu-se aos tecidos vegetais. O método estima o produto corado resultante da redução do ferro férrico do TPTZ, detetando compostos com potencial de redução inferior a 0,7 V, o potencial de redução do  $Fe^{3+}$ -TPTZ. Deste modo, o método do FRAP efetua um rastreio razoável da manutenção do ambiente redox das células ou tecidos. Este poder redutor parece estar correlacionado com o grau de hidroxilação e a extensão da conjugação de polifenóis. No entanto, o método FRAP não permite a deteção de compostos que atuem como *quencher*s de radicais, em

particular tióis não proteicos e proteínas, razão pela qual constitui um método complementar ao da quantificação da capacidade tampão redox do glutatióno que pode ser estimada pela razão GSH/GSSG (Lata, 2008; Prior, 2005; Tsao, 2005).

O DPPH é um radical livre estável, que em solução exibe cor violeta com um máximo de absorção característico a 515 nm que vem sendo utilizado para estimar a capacidade antioxidante para os fluidos biológicos capturarem ROS. O método foi descrito pela primeira vez por Brand-Williams (1995) e baseia-se na quantificação da perda de cor da solução de DPPH, devido à captura do referido radical (Iacopini, 2010; Endo, 2006; Prior, 2005).

Os sistemas enzimáticos antioxidantes envolvem atividades enzimáticas como superóxido dismutase (SOD) que catalisa a dismutação do radical anião superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ) a peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) e  $O_2$ , peroxidases (POD) e glutatióno peroxidase (GPx), que atuam sobre peróxidos e lipoperóxidos, sem e com utilização do glutatióno como cosubstrato (Sies, 1997; Bonatto, 2007).

A família de metaloenzimas SOD é considerada como uma das primeiras na linha de defesa antioxidante. Estes catalisam a dismutação de  $O_2^{\cdot -}$  em  $H_2O_2$  e  $O_2$  por reações de Haber-Weiss e está presente em todos os organismos aeróbios e componentes subcelulares sensíveis ao stress. Os enzimas SODs são classificados em três tipos, de acordo com o seu co-fator metálico, Fe-SOD, localizado nos cloroplastos, Mn-SOD, localizado nos mitocôndrios e Cu/Zn-SOD, localizado nos cloroplastos, peroxissomas e citoplasma (Bera, 2011; Karuppanapandian, 2011).

Por outro lado, o ciclo de oxidação/redução do glutatióno assegurado pela atividade enzimática glutatióno peroxidase dependente do Se, referido anteriormente, completa-se com o enzima glutatióno redutase que recicla o GSH a partir do GSSG libertado pelo GPx (Valle, 2011; Reuter, 2010).

O funcionamento do ciclo do glutatióno pode ser assegurado pelos equivalentes redutores disponibilizados pelo enzima glucose-6-fosfato desidrogenase, descoberto por Warburg e Christian, em 1931, e purificado na forma cristalina por Noltmann a partir de *S. cerevisiae* de cerveja (Ozer, 2001). Este enzima catalisa o passo regulador da via das pentoses fosfato (PPP), o qual para além de gerar equivalentes redutores sob a forma de NADPH, gera pentoses fosfato necessárias à biossíntese de nucleótidos e constitui uma porta de entrada de pentoses na via glicolítica. Os equivalentes redutores sob a forma de NADPH gerados por esta via são ainda utilizados na biossíntese de ácidos gordos e colesterol. (Kang, 1996). O enzima, de localização citoplasmática é ubiquamente distribuído na natureza (Ozer, 2001).

A atividade enzimática prolina desidrogenase é descrita por diversos autores como sensível à pressão ambiental exercida por diversos agentes de stress que reprimem a sua expressão, facilitando a biossíntese e acumulação de prolina. Os níveis de prolina retornam

aos valores basais quando são aniquilados os efeitos do agente de stress. O enzima pode ainda ser encarado como fonte de energia para a recuperação de condições de stress (Cecchini, 2011).

Os enzimas catalase são hemoproteínas compostas por quatro subunidades idênticas de 60 kDa, dispostas segundo uma geometria tetraédrica. Este tipo de enzimas possui um grupo ferroprotoporfirínico por subunidade que constituem os centros catalíticos envolvidos na decomposição reversível do peróxido de hidrogénio em água e dióxigénio (Matès, 2000).

O  $H_2O_2$  pode também ser catabolizado enzimaticamente nos organismos aeróbios por várias peroxidases, como foi referido no início desta seção. Mesmo quando presente parece que a atividade catalase não é essencial para alguns tipos de células, mas o enzima desempenha um papel relevante na tolerância ao stress oxidativo. A atividade catalase, pode ser detetada no citoplasma e na matriz do peroxissoma, um organelo presente em praticamente todas as células eucariotas e que expressa também diversos tipos de oxidases, geradores de  $H_2O_2$ . Por esse motivo, a atividade catalase vem sendo utilizada há algum tempo como marcadora enzimática da função peroxissomal (Horiguchi, 2001).

## **1.5 *Saccharomyces cerevisiae* – modelo biológico para estudos de stress**

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é descrita como um dos modelos eucariotas mais simples no qual muitos dos processos essenciais se encontram conservados e com homologia aos de humanos. Devido à sua fácil manipulação génica, genoma sequenciado e tempo de geração curto, é amplamente usado como sistema modelo para estudos de stress oxidativo a nível celular e molecular (Bayliak, 2011; Zakrajšek, 2011).

Além disso, células de levedura em fase estacionária assemelham-se às dos organismos multicelulares, uma vez que a respiração disponibiliza a maior parte da energia inerente à sua sobrevivência, encontram-se na fase G0; acumulam danos cronológicos; e possuem os mesmos mecanismos de defesa implicados na redução de ROS, como o ciclo do glutathione e catalases, e de eliminação de danos irreparáveis, comuns aos eucariotas superiores em todos os níveis de organização celular (Zakrajšek, 2011).

As vias de sinal são dos sistemas melhor conservados ao longo da evolução de *S. cerevisiae*, permitindo assim a sua utilização como modelo eucariota para caracterizar as vias de sinalização celular redox e avaliar o potencial antioxidante dos compostos naturais in vivo (Vilaça, 2012).

O crescimento é normalmente acompanhado por parâmetros como: turbidez do meio, quantidade de biomassa formada, contagem de unidades formadoras de colónias que, ao contrário da turbidez, quantifica apenas as células viáveis e ainda pelo marcador enzimático de diferenciação e crescimento celular, fosfatase alcalina.

O enzima fosfatase alcalina de leveduras desempenha um papel crucial na mobilização de energia que assegura a manutenção de funções celulares como a diferenciação, replicação ou metabolização de substratos nutricionais, processos bioquímicos fundamentais à vida, uma vez que está envolvido na hidrólise de ligações monofosfoéster de elevado potencial químico (Onishi, 1979; Eguchi, 1995).

Em situações de stress oxidativo ou de morte por processo ativo, a expressão génica do enzima varia de acordo com as necessidades energéticas da célula que entretanto aumentam, e a fase do ciclo celular, sendo por esse motivo um marcador da diferenciação e do crescimento (Onishi, 1979; Souvannavong, 1995; Koksharov, 2013; Liu, 2013).

## **1.6. Vanádio um agente oxidante**

O Vanádio, como metal de transição pode existir em diferentes estados de oxidação: -1, 0, 2, 3, 4, e 5. O óxido mais comum e tóxico deste elemento é o pentóxido de vanádio ( $V_2O_5$ ), onde o metal se encontra no estado de oxidação +5 (González-Villalva, 2011; Costigan, 2001).

Apesar de relativamente comum na crosta terrestre, o vanádio é passível de exploração mineira em poucas regiões. As suas principais fontes comerciais são as magnetites titaníferas da África do Sul, China e antiga União Soviética (Schuler, 2011; Costigan, 2001).

O  $V_2O_5$  é libertado para o ambiente em grandes quantidades a partir de fontes antropogénicas, devido à sua utilização como catalisador na produção de ácido sulfúrico, durante a combustão de petróleo e carvão e em procedimentos de endurecimento de ligas metálicas. Alguns dos seus compostos podem também ser utilizados na produção de pigmentos ou agentes de coloração (Schuler, 2011; Yu, 2011; Assem, 2009; Moskalyk, 2003).

Quando utilizado na indústria do aço forma  $V_4C_3$  com qualquer átomo de carbono presente, produzindo, assim, uma liga de grão fino, com maior resistência ao desgaste e a temperaturas mais elevadas, propriedades que são avaliadas no fabrico de ferramentas e dispositivos de alta velocidade. Em ligas de titânio e alumínio possui uma série de aplicações, como por exemplo, a indústria aeroespacial e implantes cirúrgicos (Schuler, 2011).

Na população humana em geral, os alimentos são a principal fonte de vanádio, cujas concentrações mais elevadas são detetadas em crustáceos, cogumelos, salsa, endro e pimenta preta. Contudo os óxidos de vanádio fracamente solúveis e insolúveis são dificilmente absorvidos a partir do trato intestinal, sendo no entanto, facilmente absorvidos pelo pulmão, por inalação devido a exposição ocupacional, razão pela qual os óxidos

constituem provavelmente a maior fonte de preocupação relativa a humanos (Schuler, 2011).

Em modelos experimentais têm sido descritos efeitos nocivos como hematotoxicidade, genotoxicidade, imunotoxicidade e toxicidade reprodutiva pelo vanádio (González-Villalva, 2011).

## 2. Problemática e objetivos

### 2.1. Problemática

A região da Beira Alta é propícia à cultura da maçã pois, devido à sua diversidade de microclimas produz frutos de características particulares tendo sido por isso distinguida com uma Indicação Geográfica Protegida (IGP), denominada “Maçã da Beira Alta” que inclui variedades como *Golden Delicious* e *Starting*, entre outras, tradicionalmente cultivadas nesta região de Portugal e uma Denominação de Origem Protegida (DOP), designada “Bravo de Esmolfe”, relativa a uma variedade regional com características únicas, extremamente aromática, agri-doce, de reconhecido valor nutritivo e elevada capacidade antioxidante. Por outro lado, a maçã tem vindo a merecer grande destaque a nível mundial por ser cada vez mais recomendada como alimento indispensável numa alimentação saudável. Devido às suas propriedades nutricionais e funcionais como o elevado conteúdo em vitaminas do complexo B e ascorbato, em frutose e polifenóis antioxidantes, bem como em fibras, tem merecido especial atenção pela comunidade científica, que tem revelado efeitos benéficos da maçã para várias patologias humanas. Assim, neste estudo procurou-se caracterizar maçãs produzidas na região da Beira Alta em Portugal, tendo em vista contribuir para valorizar a maçã nacional e avaliar se a data de colheita e a variedade de maçã podem influenciar as propriedades nutritivas, antioxidantes e de conservação deste fruto, assim como as suas propriedades biológicas *in vivo*, recorrendo ao modelo eucariota celular *S. cerevisiae* e ao agente de *stress* pentóxido de vanádio.

## 2.2. Objetivo Geral

O presente estudo teve como principal objetivo testar as hipóteses:

H<sub>0</sub>: As propriedades antioxidantes, nutritivas e de conservação das variedades de maçã Bravo de Esmolfe, *Starking* e *Golden Delicious*, cultivadas na Beira Alta não diferem entre si nem dependem da data de colheita.

H<sub>0</sub>: O pentóxido de vanádio e os extratos aquosos de maçã não perturbam o crescimento nem as propriedades antioxidantes de *S. cerevisiae*.

## 2.3. Objetivos específicos

### Conhecer e compreender

- O protocolo para a obtenção de extratos, aquosos, etanólicos e tamponados de polpa e pele de maçã;
- As propriedades nutritivas, antioxidantes e conservação de três variedades de maçã;
- O protocolo para a determinação da atividade biológica do extrato aquoso de polpa de maçã;
- As propriedades antioxidantes do extrato aquoso de polpa de maçã em *S. cerevisiae*;

### Valorizar

- As condições para obtenção dos extratos de maçã;
- O conteúdo em glícidos, vitaminas do complexo B e atividade SDH como marcadores nutricionais da maçã;
- O conteúdo em polifenóis, ascorbato, glutatióno, prolina e as atividades PDH, POD, GPx, SOD e G6PD como marcadores antioxidantes e de conservação da maçã;
- Os métodos DPPH e FRAP como estimativa da capacidade antioxidante complementar à do glutatióno;
- A qualidade das curvas de calibração nos métodos quantitativos;
- A qualidade das curvas de reação enzimáticas de frutos e leveduras;
- A estimativa da biomassa pelo peso seco e conteúdo em tíois totais não-proteicos, bem como da atividade ALP como marcadores do crescimento celular de leveduras;
- A estimativa de cfu como marcadora de viabilidade celular;
- O papel do glutatióno no controlo do ambiente redutor celular;
- As atividades GR e Catalases A e T como marcadores de stress em leveduras;



- As respostas celulares e moleculares de *S. cerevisiae* ao  $V_2O_5$  na ausência e na presença de extrato aquoso de maçã ;

### **Aplicar**

- A estimativa de propriedades nutritivas, antioxidantes e de conservação da maçã para ampliar o seu valor funcional;
- A resposta dos marcadores antioxidantes e de conservação para definir novas estratégias de comercialização;
- O valor funcional da maçã para consolidar o seu valor de mercado;
- Os métodos aferidos neste trabalho na caracterização de outras variedades de maçã ou de outros frutos com interesse económico.



## 3. Metodologia

### 3.1 Estratégia

A concretização dos objetivos traçados para este trabalho obedeceu ao plano:

**Local de Realização:** Laboratório de Bioquímica Analítica, Fase III do Colégio Luís António Verney, Universidade de Évora.

**Suporte financeiro:** Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas FT/ICAAM e Departamento de Química, Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora.

**Duração:** 1 ano letivo

#### **Modelo Biológico:**

- ❖ Fruto de *Malus domestica* Bokh. Polpa e pele de maçã homogeneizada em diferentes extratos.
- ❖ Origem: Cultivares Bravo de Esmolfe, *Golden Delicious* e *Starking* de pomares de Celorico da Beira, Beira Alta, Portugal.
- ❖ Levedura *Sacharomyces cerevisiae* BY4741. Origem: Coleção EUROSCARF.

**Agente oxidante:** pentóxido de vanádio ( $V_2O_5$ ).

**Ensaio:** Foram colhidos seis frutos de cada variedade em dois tempos diferentes de colheita (início e fim de colheita), obtenção de diferentes extratos: a pele foi homogeneizada em água e etanol e a polpa em água, tampão fosfato e etanol, determinação do seu valor nutritivo, capacidade antioxidante e atividade biológica em *Saccharomyces cerevisiae* na presença de um oxidante.

#### **Parâmetros a analisar:**

- ✓ Valor nutritivo de *Malus domestica* em diferentes tempos de colheita:
  - Tiamina (extrato aquoso de polpa e pele)
  - Riboflavina (extrato aquoso de polpa e pele)
  - Glúcidos totais (extrato aquoso de polpa e pele)
  - Glúcidos redutores (extrato aquoso de polpa e pele)
  - Sorbitol desidrogenase (extrato tamponado da polpa)

- ✓ Capacidade antioxidante de *Malus domestica* em diferentes tempos de colheita:
  - Polifenóis totais (extrato aquoso e etanólico de polpa e pele)
  - método DPPH (extrato aquoso e etanólico de polpa e pele)
  - método FRAP (extrato aquoso de polpa e pele)
  - Ascorbato (extrato aquoso de polpa e pele)
  - GSH (extrato aquoso de polpa)
  - GSSG (extrato aquoso de polpa)
  - GSH/GSSG
  - Prolina (extrato aquoso de polpa)
  - Prolina desidrogenase (extrato tamponado da polpa)
  - Peroxidase (extrato tamponado da polpa)
  - Glutatio peroxidase (extrato tamponado da polpa)
  - Superóxido dismutase (extrato tamponado da polpa)
  - Glucose-6-fosfato desidrogenase (extrato tamponado da polpa)
- ✓ Atividade biológica de extrato aquoso de polpa de *Malus domestica* em *Saccharomyces cerevisiae* na presença de um oxidante:
  - Peso seco
  - Viabilidade celular por cfu
  - Fosfatase alcalina
  - GSH
  - GSSG
  - GSH/GSSG
  - Glutatio redutase
  - Glutatio peroxidase
  - Catalase T
  - Catalase A
  - ROS
  - MDA

#### **Técnicas utilizadas**

- ✓ Homogeneização por homogeneizador de lâminas
- ✓ Obtenção de extrato aquoso, em meio tamponado e alcoólico
- ✓ Centrifugação preparativa
- ✓ Cultura de microrganismos
- ✓ Desintegração celular, por homogeneizador de sonda de ultra-sons

- ✓ Fracionamento celular, por centrifugação diferencial
- ✓ Potenciometria
- ✓ Espectrometria de absorção molecular
- ✓ Espectrometria de fluorescência

### **Análise estatística dos resultados:**

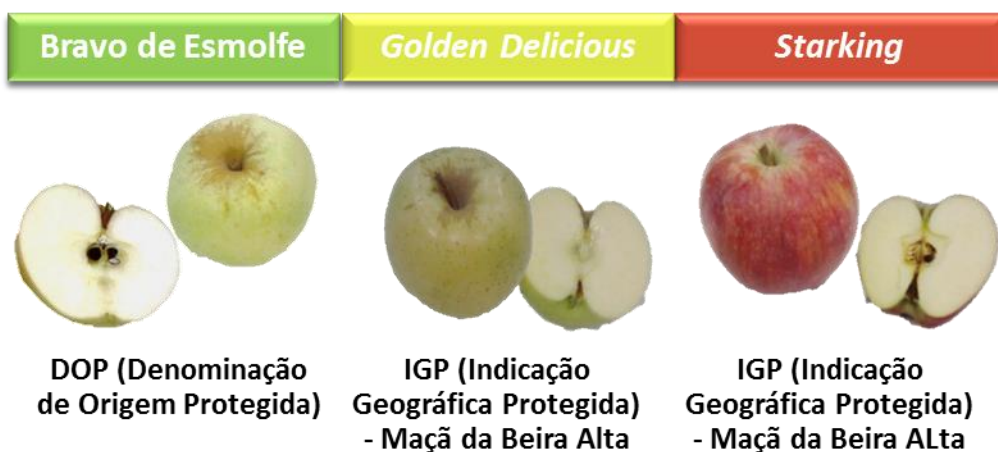
Análise de variância simples, ANOVA I e teste de significância de Duncan para os resultados obtidos nos diferentes extratos e respetivos tempos de colheita, incluindo conteúdos nutricionais, capacidade antioxidante e conteúdos e atividades enzimáticas de *S. cerevisiae* determinados nos ensaios *in vivo*. Recorreu-se ainda à análise de correlação bivariada entre os parâmetros analisados, utilizando o coeficiente de correlação bilateral de Pearson. Recorreu-se ao programa SPSS para o Windows, versão 19, licenciado para a Universidade de Évora.

## **3.2 Procedimento experimental**

### **3.2.1. Cultivares de *Malus domestica***

O estudo do valor nutritivo, capacidade antioxidante e atividade biológica de maçã, *Malus domestica* Bokh, foi realizado utilizando frutos das cultivares Bravo de Esmolfe, *Golden Delicious* e *Starking*, cultivadas sob práticas culturais e condições ambientais idênticas em pomares comerciais de produção de maçã localizados em Celorico da Beira, Beira Alta, Portugal (Quadro 3.1). As cultivares foram selecionadas devido à sua elevada importância não só agro-económica mas também ecológica, especialmente no caso da Bravo de Esmolfe, por se tratar de uma variedade portuguesa com DOP.

**Quadro 3.1.** Variedades de *Malus domestica* Bokh utilizadas no estudo.



### 3.2.2. Colheita e preparação dos frutos para análise

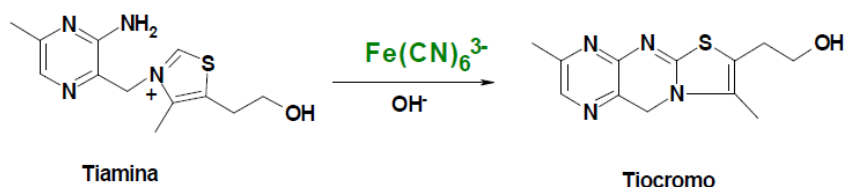
Maçãs das três cultivares foram colhidas aleatoriamente, em pomares na região de Celorico da Beira em Setembro de 2012 no ótimo de maturação em alturas distintas do período de colheita comercial, início (17 de Setembro) e fim (23 de Setembro). Os frutos, seis por cultivar em estudo, foram lavados em água corrente, limpos em papel absorvente, pesados individualmente (de 156,06 a 302,57 g/fruto), descascados e descaroçados, com recurso a uma faca, obtendo-se dois tipos de amostra, a polpa e a pele. No homogeneizador de lâminas a pele foi homogeneizada, em dois solventes diferentes: água (p/v 1:2,5) e etanol 12 % (p/v 1:3). Enquanto a polpa foi homogeneizada em três solventes: água (p/v 2:1), tampão fosfato 0,12 M pH 7,2 (p/v 1:1) ou em etanol 12 % (p/v 1:2).

Todos os extratos foram clarificados por centrifugação a 18000 g durante 40 min a 4 °C e o sobrenadante guardado em alíquotas a -20 °C até posterior análise.

### 3.2.3. Determinação de conteúdos

#### 3.2.3.1. Tiamina

A tiamina, vitamina B1, após ser extraída com HCl (0,1 M) em amostras aquosas de pele e polpa, sofreu um processo de oxidação mediado pelo ferricianeto de potássio alcalino (1 %) que permite a posterior deteção por fluorescência da vitamina sob a forma de tiocromo, de acordo com a equação:



O tiocromo resultante foi então extraído com butanol e quantificado por espectrofluorimetria ao  $\lambda_{exc}$  de 378,7 nm e  $\lambda_{em}$  de 433,6 nm (Plaza, 2003).

A concentração em tiamina nas amostras foi determinada por interpolação na curva padrão de tiamina construída no intervalo de concentração de 0-0,104 µg/mL (Fig. A1).

#### 3.2.3.2. Riboflavina

A riboflavina, tal como a tiamina, é vital para a utilização adequada de glúcidos, lípidos e proteínas como fonte de energia. Especificamente, a riboflavina (ou vitamina B2) é um componente de duas coenzimas, flavina adenina dinucleótido (FAD) e flavina mononucleótido (FMN). O FAD e FMN podem facilmente perder ou ganhar eletrões e

átomos de hidrogênio, auxiliando certas enzimas nas reações de oxidação/redução em cadeias de transporte de elétrons e uma grande variedade de vias metabólicas. Esta vitamina é ainda fluorescente e assim, a sua intensidade de fluorescência é proporcional à sua concentração.

A riboflavina foi extraída, de amostras aquosas de pele e polpa, com HCl (0,1 M) e quaisquer substâncias interferentes recorrendo à sua eliminação pelo permanganato de potássio (4 %).

A mistura de reação era composta por volume adequado de amostra, HCl (0,1 M), ácido acético glacial, permanganato de potássio (4%), peróxido de hidrogênio (3 %), deixada repousar durante 5 min e lida a fluorescência ao  $\lambda_{exc}$  de 488 nm e  $\lambda_{em}$  525 nm (Plaza, 2003).

A concentração em riboflavina nas amostras foi determinada por interpolação na curva padrão de tiamina construída no intervalo de concentração de 0-5  $\mu\text{g/mL}$  (Fig. A2).

### 3.2.3.3. Glúcidos totais

A determinação do teor em glúcidos totais nas amostras aquosas de pele e polpa foi realizada segundo um método colorimétrico simples e rápido, o método fenol-sulfúrico (Dubois, 1956).

Neste método o ácido sulfúrico concentrado hidrolisa os polissacáridos, oligossacáridos e dissacáridos a monossacáridos, originando derivados que ao condensarem com fenol formam um composto amarelo-dourado estável, sendo possível a sua quantificação por espetrometria de absorção molecular a 490 nm.

A mistura de reação constituída pelo padrão ou amostra, ácido sulfúrico concentrado e fenol (5 %) na proporção de 1:3:0,6 foi aquecida em banho de água a 90 °C durante rigorosamente 5 min e imediatamente arrefecida à temperatura ambiente antecedente da leitura da absorvência dos padrões e das amostras.

A concentração de glúcidos totais nas amostras foi determinada por interpolação na curva padrão de glucose construída, num intervalo de concentração de 0-10  $\text{mg/mL}$  (Fig. A3).

### 3.2.3.4. Glúcidos redutores

O teor em glúcidos redutores presentes nas amostras aquosas de polpa e pele de maçã foi determinado pelo método do DNS (Miller, 1959), que envolve a deteção do grupo carbonilo. Assim, em condições alcalinas, ocorre a oxidação do grupo carbonilo (C=O) do glúcido, em simultâneo com a redução do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) a ácido 3-amino,5-nitrosalicílico, um produto castanho avermelhado, com absorção máxima a 540 nm (Bittman, 1974).

A mistura de reação constituída pelo padrão ou a amostra, água bidestilada e reagente de DNS, na proporção de 1:1:2 foi aquecida em banho de água em ebulição durante rigorosamente 5 min e imediatamente arrefecida à temperatura ambiente seguindo-se a leitura da absorvência dos padrões e das amostras.

A concentração de glúcidos redutores nas amostras foi determinada por interpolação na curva padrão de glucose construída, num intervalo de concentração de 0-2 mg/mL (Fig. A4).

### **3.2.3.5. Proteína**

A determinação do conteúdo em proteína aquo-solúvel foi realizada pelo método descrito por Lowry (1951). Este método, em condições alcalinas, baseia-se na reação do Biureto em que o  $\text{Cu}^{2+}$  forma um complexo com as ligações peptídicas das proteínas seguida da redução do ácido fosfomolibdicofosfotúngstico (reagente de Folin-Ciocalteu) a azul de heteromolibdénio por oxidação de aminoácidos aromáticos, tendo o cobre como catalisador.

O composto formado apresenta o seu máximo de absorção a 720 nm, possibilitando assim, a quantificação de proteínas através da lei de Lambert - Beer, por interpolação na curva padrão construída recorrendo à albumina de soro bovino (BSA), numa gama de concentração de 0-200  $\mu\text{g/mL}$  (Fig. A5).

O reagente de Lowry, preparado pela adição de sulfato de cobre pentahidratado (1 %) a tartarato de sódio e potássio (0,2 %) em carbonato de sódio a (2 %) foi adicionado à solução-padrão de BSA ou amostra e NaOH (0,5 M), na relação de 1:4:25. A mistura, após agitação no vórtex, incubou 10 min à temperatura ambiente antes da adição do reagente de Folin-Ciocalteu, solução comercial diluída  $\frac{1}{2}$  em água bidestilada, na relação de 12:1. A formação de azul de heteromolibdénio ocorreu durante 30 min à temperatura ambiente, após o que foi lida a absorvência (Antharavally, 2008).

### **3.2.3.6. Polifenóis totais**

O teor em fenóis foi determinado como descrito por Singleton (1965) em amostras aquosas e etanólicas de polpa e pele. Utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu, uma mistura de ácido fosfotúngsténico e ácido fosfomolibdico, que em condições alcalinas e ao oxidar os fenóis é reduzida a uma mistura de óxidos azuis de tungsténio e de molibdénio. A coloração azul produzida, com máximo de absorção a 760 nm, é proporcional ao teor em compostos fenólicos, expresso como equivalente de ácido gálico, numa curva padrão construída entre valores de concentração de 0-100 mg/L (Fig. A6).

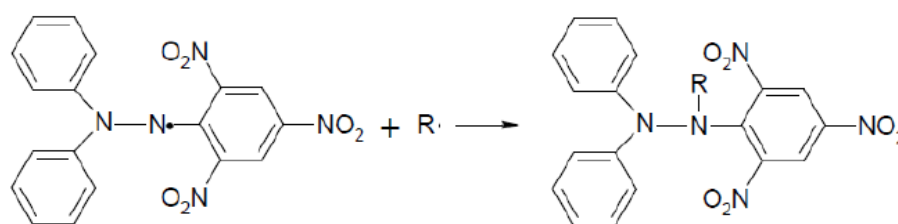
A mistura de reação continha reagente de Folin-Ciocalteu comercial diluído 10x, carbonato de sódio (7,5 %) e volume adequado de amostra (extrato aquoso polpa e casca e extrato etanólico para polpa e casca) ou padrão. A solução anterior foi cuidadosamente



agitada no vórtex e incubada ao abrigo da luz a 25 °C durante 90 min, após o que foi lida a absorvência a 760 nm.

### 3.2.3.7. Capacidade antioxidante pelo método do DPPH

Recorreu-se ao método reconhecido por DPPH para medir o poder antioxidante das amostras aquosas e etanólicas de pele e polpa, quantificando a sua capacidade para capturar o radical orgânico estável DPPH<sup>•</sup> (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo), um cromóforo de cor púrpura com um máximo de absorção a 515 nm. O antioxidante (AH) ao reduzir o radical DPPH<sup>•</sup> origina um produto estável, o DPPH-H (difenil-picril-hidrazina) de cor amarela, de acordo com a equação (Blois, 1958):



Na determinação da capacidade antioxidante utilizou-se uma solução de DPPH<sup>•</sup> (0,03 g/L em metanol), a qual foi preparada sempre que necessário e mantida ao abrigo da luz. Em células de absorção molecular foi adicionada a solução de DPPH<sup>•</sup>, um volume conhecido de amostra ou padrão e acompanhada a variação de absorvência a 515 nm, devido à redução do DPPH<sup>•</sup>, a 25 °C durante 180 s.

A determinação da capacidade antioxidante das amostras foi estimada por interpolação gráfica, na curva de calibração, na qual foi usado o ácido gálico como padrão, no intervalo de concentração de 0-200 mg/L (Fig. A7).

### 3.2.3.8. Capacidade antioxidante pelo método do FRAP

Descrito por Benzie (1999), o método do FRAP permite determinar, por espectroscopia de absorção molecular, a capacidade antioxidante dependente do ião ferro. Este assenta na capacidade redutora dos antioxidantes, na presença do reagente de FRAP. Nesta reação, em meio ácido, a espécie Fe(III) encontra-se complexada com o TPTZ, formando assim o complexo férrico Fe(III)-TPTZ. Este atua como oxidante, permitindo que os antioxidantes se oxidem reduzindo-o a Fe(II), com formação do complexo ferroso Fe(II)-TPTZ que apresenta coloração azul, podendo assim ser detetado por espectroscopia de absorção molecular a 593 nm (Berker, 2007).

O reagente de FRAP composto por cloreto de ferro (20 mM), TPTZ (10 mM) em HCl (40 mM) e tampão acetato de sódio (300 mM) pH 3,6 numa proporção de 1:1:10 (v/v/v) foi

adicionado a uma alíquota de padrão ou amostra (aquosa de polpa e pele) e registada a variação de absorvência a 593 nm, durante 120 s a 37 °C.

A determinação da capacidade redutora do ferro presente nas amostras foi realizada por interpolação gráfica, na curva de calibração, na qual foi usado trolox como padrão, no intervalo de concentração de 0-16 mg/mL (Fig. A8).

### **3.2.3.9. Ascorbato**

O doseamento do ascorbato foi realizado em amostras aquosas da pele e polpa de acordo com o método descrito por Cai (1999), recorrendo às propriedades redutoras do ascorbato (Hu, 2009). O meio ácido permite a redução de Fe (III) a Fe (II) pelo ascorbato que é oxidado levando à formação de dihidro-ascorbato. A formação de um complexo corado pela reação entre o Fe (II), então formado, e o reagente batofenantrolina permite a sua quantificação por espectroscopia de absorção molecular no seu máximo de absorção, a 534 nm, 25 °C

A quantificação do ascorbato foi realizada pela preparação de uma mistura contendo TCA (5 %), H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> em etanol (0,4 %), batofenantrolina em etanol (0,5 %), FeCl<sub>3</sub> em etanol (0,03 %) e volume adequado de amostra ou de solução-padrão. A mistura incubou a 30 °C durante 90 min, levando à formação do complexo Fe (II) – batofenantrolina. A concentração de ascorbato nas amostras foi determinada por interpolação na curva padrão de ascorbato construída no intervalo de concentração de 0-30 µg/mL (Fig. A9).

### **3.2.3.10. GSH e GSSG**

O nível citoplasmático de GSH e GSSG foi determinado de acordo com o método fluorimétrico proposto por Hissin (1976) em que a NEM sequestra o GSH endógeno e OPT originando um fluoróforo quantificável por espectrometria de fluorescência.

No caso do GSH incubaram-se amostras aquosas de pele e polpa em tampão fosfato de sódio pH 8,0 (0,1M) com EDTA (0,005 M) e 0,1 mL de OPT em etanol absoluto para um volume final de 2,0 mL. Agitou-se e deixou-se a mistura reacional à temperatura ambiente durante 15 min, lendo-se a potência de fluorescência aos  $\lambda_{exc}$  de 350 nm e  $\lambda_{em}$  de 420 nm.

Calculou-se a concentração de GSH das amostras por interpolação gráfica recorrendo à curva de calibração previamente construída com GSH para o intervalo de concentração 0-100 µM (Fig. A10).

A determinação do conteúdo em GSSG em amostras de pele e polpa da fração aquosa iniciou-se com a incubação de quantidade necessária de amostra com NEM (20 µM), durante 30 min, à temperatura ambiente, da qual se tiraram alíquotas de 0,1 mL que foram adicionadas a 1,8 mL de NaOH (0,1M) e 0,1 mL de OPT, lendo-se a potência de fluorescência da mistura a  $\lambda_{exc}$  de 350 nm e  $\lambda_{em}$  de 420 nm.

Calculou-se a concentração em GSSG na fração pós-peroxissomal por interpolação gráfica recorrendo à curva de calibração previamente construída com GSSG entre 0-24  $\mu\text{M}$  (Fig. A11).

### 3.2.3.11. Prolina

O conteúdo em prolina foi determinado na amostra aquosa da polpa recorrendo a ninidrina ácida e segundo o método adaptado de Bates (1973). Em ebulição, a prolina quando em contato com a ninidrina em meio ácido origina uma formazona de cor vermelha, quantificável a 546 nm.

A mistura de reação era composta por volume adequado de amostra, ácido acético glacial e ninidrina ácida (ácido acético glacial:água:ácido ortofosfórico 85% na proporção 6:3:1) e levada em banho em ebulição durante 1 hora. Após arrefecer foi lida a absorvência a 546nm.

A concentração em prolina nas amostras foi determinada por interpolação na curva padrão de L-Prolina construída no intervalo de concentrações de 0-12 mg/L (Fig. A12).

### 3.2.3.12. ROS

O nível de ROS na amostra foi determinado de acordo com o método fluorimétrico proposto por LeBel (1990) que utiliza a 2',7'- diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) para determinar os níveis de peróxido de hidrogénio. O DCFH-DA é hidrolizado por esterases no composto não fluorescente 2',7'- diclorofluoresceína (DCFH), o qual na presença de peróxido de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) é rapidamente oxidado a 2',7'- diclorofluoresceína (DCF) que apresenta fluorescência elevada (LeBel, 1990).

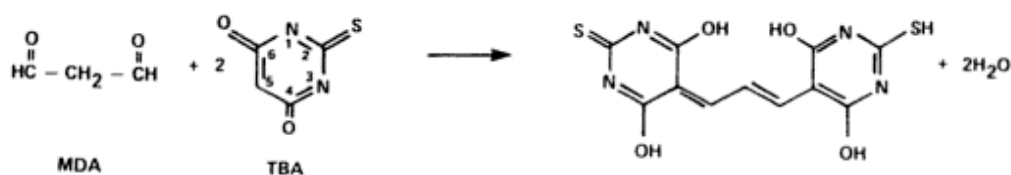
Na determinação da quantidade de ROS presente na fração sobrenadante pós-12000 g, após estabilização do DCFH (25 M) em tampão Tris-HCl (40 mM) pH 7,4 a 37 °C, durante 5 min, iniciou-se a reação pela adição de uma alíquota de amostra, num volume final de 2 mL, seguida de incubação durante 10 min a 37°C, após o que se fez a leitura da potência de fluorescência da mistura a  $\lambda_{\text{exc}}$  de 488 nm e  $\lambda_{\text{em}}$  de 525 nm.

A solução DCFH (1 mM) foi previamente preparada em tampão fosfato (25 mM) pH 7,4 com NaOH (0,01 M). Calculou-se a quantidade de ROS nas amostras por interpolação gráfica recorrendo à curva de calibração previamente preparada com peróxido de hidrogénio, no intervalo de valores de 0-400 mM (Fig. A13).

### 3.2.3.13. MDA

Malondialdeído (MDA) é um dos subprodutos formados por peroxidação lipídica. Assim, e segundo o método descrito por Ohkawa (1979) a pH ácido e temperatura elevada, o MDA reage com o TBA (ácido tiobarbiturico) por uma reação de adição nucleófila, dando origem a

um aduto fluorescente vermelho com elevada intensidade de fluorescência  $\lambda_{exc}$  de 553 nm e  $\lambda_{em}$  de 515 nm, sendo assim possível a sua quantificação.

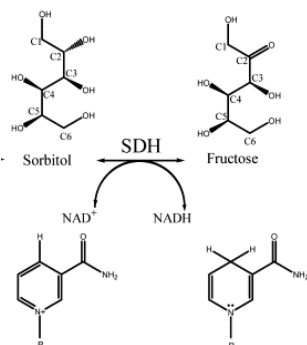


Calculou-se o teor em MDA das amostras por interpolação gráfica recorrendo à curva de calibração previamente preparada tendo como padrão o MDA gerado a partir do 1,1,3,3-tetrametoxipropano pela sua hidrólise em meio ácido, no intervalo de valores de 0-100  $\mu\text{M}$  (Fig. A14).

### 3.2.4. Determinação de atividade enzimática

#### 3.2.4.1. Sorbitol desidrogenase

O sorbitol é o glicídio maioritário a ser translocado na maçã, a sua oxidação a frutose dá-se pela ação do enzima sorbitol desidrogenase, tendo  $\text{NAD}^+$  como cofator que por sua vez é reduzido a NADH.



Assim, e segundo Yamaki (1986), a atividade SDH foi acompanhada através da formação de NADH no seu ótimo de comprimento de onda, a 340nm.

A mistura de reação constituída por Tris-HCl (1 M) pH 9,5,  $\text{NAD}^+$  (10 mM), sorbitol (3 M) e volume adequado de amostra (0,5-0,2 mg/mL de proteína), polpa em solução tamponada, permitiu a leitura de absorvência a 340 nm durante 200 s. Determinou-se a atividade enzimática a partir do valor de coeficiente angular das curvas de reação ( $0,992041 < r < 0,963338$ ; Fig. A15 e A16) obtidas e utilizando o coeficiente de absorvidade molar para o NADH de  $6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

#### 3.2.4.2. Prolina desidrogenase

A atividade enzimática prolina desidrogenase foi seguida segundo o método descrito por Costilow (1978) acompanhando a formação de NADH a 340 nm.

A mistura de reação era constituída por tampão carbonato de sódio (100 mM) pH 10,3, L-Prolina (2 mM), NAD (10 mM) e quantidade adequada de amostra (0,5-0,2 mg/mL de proteína), polpa em solução tamponada, seguindo-se a atividade durante 180 s a 340 nm (Sarkar, 2009). Determinou-se a atividade enzimática a partir do valor de coeficiente angular

das curvas de reação ( $0,995416 < r < 0,975466$ ; Fig. A17 e A18) obtidas e utilizando o coeficiente de absorvância molar para o NADH de  $6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

### 3.2.4.3. Peroxidase

O enzima peroxidase catalisa a reação de oxidação de compostos fenólicos na presença de peróxido de hidrogénio, originando quinonas como produto, as quais são instáveis e após oxidação não enzimática, em presença de  $\text{O}_2$ , polimerizam-se formando as melaninas.

A atividade POD foi determinada de acordo com método descrito por Cano (1998) é acompanhada a formação da coloração violeta com a oxidação do reagente *p*-fenilenodiamina. Numa fase inicial e na presença de peróxido de hidrogénio, o enzima é oxidado a uma forma instável, a qual na presença de um doador de hidrogeniões, como o *p*-fenilenodiamina, sofre uma redução, regressando à sua forma nativa e estável, enquanto os doadores de hidrogeniões sofrem a oxidação dando origem a *p*-fenilenodiamina com máximo de absorvância a 485 nm (Igual, 2010).

A mistura de reação constituída por tampão fosfato de potássio (0,2 M) pH 6,5; *p*-fenilenodiamina (1%); peróxido de hidrogénio (1,5 %) e volume adequado de amostra (0,5-0,2 mg/mL de proteína), polpa em solução tamponada, permitiu acompanhar a oxidação da *p*-fenilenodiamina por leitura da absorvância durante 180 s a 485 nm, 25 °C. A atividade enzimática foi calculada a partir do valor do coeficiente angular das curvas de reação ( $0,999971 < r < 0,999928$ ; Fig. A19 e A20) obtidas e utilizando o valor do coeficiente de absorvância molar para a *p*-fenilenodiamina de  $2,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

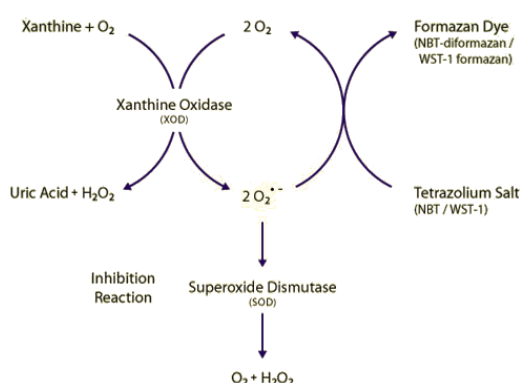
### 3.2.4.4. Glutathione peroxidase

O método descrito por Filho (1984) permitiu a determinação indireta da atividade enzimática glutathione peroxidase. Este baseia-se em duas etapas: oxidação do GSH a GSSG, catalisada pela GPx e redução do GSSG a GSH em simultâneo com a oxidação de NADPH catalisada pela glutathione reductase. A diminuição da absorvância do NADPH, a 340nm, durante a oxidação de NADPH a  $\text{NAD}^+$  é indicativa da atividade GPx, sendo que a atividade deste é fator limitante das duas reações acopladas.

A mistura de reação constituída por tampão fosfato (0,12 M) pH 7,2, GSH (5 mM), GR (0,24 U/mL) e volume adequado de amostra (0,5-0,2 mg/mL de proteína), polpa em solução tamponada, foi incubada durante 5 min a 25 °C. Iniciou-se a reação com t-BHP (1mM), registando-se a absorvância durante 180 s. Determinou-se a atividade enzimática a partir do valor de coeficiente angular das curvas de reação ( $0,9837028 < r < 0,9929592$ ; Fig. A21 e A22) obtidas e utilizando o coeficiente de absorvância molar para o NADPH de  $6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

### 3.2.4.5. Superóxido dismutase

O enzima superóxido dismutase é um metalo-enzima que catalisa a dismutação do radical anião superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ) em peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) e dióxigénio ( $O_2$ ), proporcionando uma defesa importante contra danos oxidativos. O método utilizado recorre ao sistema xantina/NBT em que o radical anião superóxido é gerado a partir da conversão de xantina e  $O_2$  em ácido úrico e  $H_2O_2$  pela xantina-oxidase (XOD). O anião superóxido converte então o NBT sal de tetrazólio em NBT-diformazan, um corante formazan. A adição de amostra, que contém SOD, à reação vai reduzir os níveis de iões superóxido, baixando assim a taxa de formação de NBT-diformazan:



A atividade enzimática da SOD na amostra é calculada como a percentagem de inibição da taxa de formação de NBT-diformazan a partir do valor de coeficiente angular das curvas de reação ( $0,998588 < r < 0,998259$ ; Fig. A23 e A24) obtidas (Oberley and Spitz, 1984).

A mistura de reação constituída por tampão fosfato (50 mM) pH 7,8, EDTA 3 mM, NBT (0,75 mM), BSA (15 %), xantina (3 mM), xantina oxidase (0,1 U/mL) e volume adequado de amostra (0,5-0,2 mg/mL de proteína), polpa em solução tamponada, registando-se a absorvência a 560 nm durante 300 s.

### 3.2.4.6. Glucose-6-fosfato desidrogenase

A determinação espectrométrica da atividade enzimática G6PD baseou-se na reação:

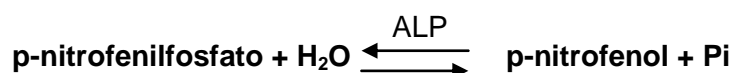


As amostras incubaram no meio de reação constituído por tris-HCl (1 M) pH 8,  $\text{NADP}^+$  (dissódico) (40 mM),  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (500 mM), glicerol (25 %) e volume adequado de amostra (0,5-0,2 mg/mL de proteína), polpa em solução tamponada, em células de espectrómetro de absorção molecular. Iniciou-se a reação com a adição de G6P (100 mM) após estabilização

a 30 °C durante 1min. Acompanhou-se a formação de NADPH, lendo a absorvência a 340 nm, durante 800 s, a 30 °C (Bergmeyer, 1983). Determinou-se a atividade enzimática a partir do valor de coeficiente angular das curvas de reação ( $0,998153 < r < 0,9729517$ ; Fig. A25 e A26) obtidas e utilizando o coeficiente de absorvidade molar para o NADPH de  $6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

#### 3.2.4.7. Fosfatase alcalina

A fosfatase alcalina constitui um marcador enzimático funcional de proliferação celular, utilizado em estudos de toxicidade por metais (Krauss, 1991; Deng, 2002; Davies, 2004). A determinação espectral da sua atividade enzimática foi determinada na fração pós-12000 g de acordo com o método proposto por Breaudiere (1984), fundamentando-se na reação:

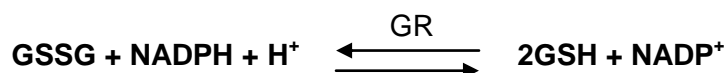


acompanhando a hidrólise das ligações fosfoéster do substrato, pelo aumento de absorvência a 405 nm ao longo de 180 s. Deste modo, foi possível utilizar um substrato cromogéneo sintético, o p-nitrofenilfosfato (pNPP) e estudar a sua hidrólise catalisada pela fosfatase alcalina, em que o pNPP forma p-nitrofenol (pNP) e fosfato inorgânico.

Incubaram-se alíquotas de fração sobrenadante pós-12000 g, na diluição adequada de proteína (0,5 mg/mL) em células de absorção que continham uma mistura de reação composta por pNPP (6 mM) em tampão Tris-HCl (0,5 mM) pH 8,5. Utilizou-se o valor do coeficiente de absorvidade molar para o pNPP de  $18,5 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$  para o cálculo da atividade enzimática. Os valores de atividade ALP referente a cada tratamento foram calculados a partir do coeficiente angular de curvas de reação ( $0,999936 < r < 0,999592$ ; Fig. A27 e A28).

#### 3.2.4.8. Glutathione redutase

A determinação espectral da atividade enzimática glutathione redutase fundamenta-se na reação:



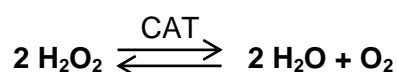
Apesar de reversível, a reação dá-se em maior extensão no sentido que conduz à formação da forma reduzida do glutathione. A atividade catalítica foi determinada de acordo com o método proposto por Goldberg e Sponer (1987) no sobrenadante pós-12000 g, acompanhando o decréscimo de absorvência a 340 nm devido à oxidação do NADPH.

Incubaram-se alíquotas de amostra (1 mg/mL proteína) em células de absorção do espectrómetro de absorção molecular que continham o meio de reação composto por dissulfureto de glutationo (6,35 mM), EDTA (0,15 mM) e NADPH (0,17 mM) dissolvidos para 1 mL em tampão fosfato (0,12 M) pH 7,2.

Procedeu-se a pré-incubação do meio reacional a 37 °C durante 5 min, e iniciou-se a reação com a adição de 0,017 mL de NADPH. Registou-se a variação de absorvência durante 180 s, nas mesmas condições de temperatura. As leituras foram efetuadas contra um branco previamente preparado no qual se substituiu a solução de NADPH por igual volume de solução tampão. Determinou-se a atividade enzimática, a partir do valor do coeficiente angular de curvas de reação ( $0,999692 < r < 0,997947$ , Fig. A29 e A30) obtidas e utilizando o valor do coeficiente de absorvidade molar para o NADPH de  $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### 3.2.4.9. Catalase

A atividade enzimática das Catalase A e T foi determinada segundo o método descrito por Beers (1952), na fração peroxissomal e citosólica respetivamente, em que é acompanhado o desaparecimento de peróxido de hidrogénio a 240 nm.



A reação decorreu a 25 °C, durante 120 s no meio de reação composto por tampão fosfato (50 mM) pH 7,0 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 mM) e sobrenadante pós-12000 g (CAT T) ou o sedimento pós-12000 g (CAT A) com concentração aproximada de proteínas de 0,035 mg/mL e 0,115 mg/mL, respetivamente. A atividade enzimática foi determinada a partir do valor do coeficiente angular das curvas de reação ( $0,99502 < r < 0,99256$ ; Fig. A31, A32, A33 e A34), utilizando o coeficiente de absorvidade molar para o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de  $0,0435 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

## 3.2.5. Atividade biológica em *Sacharomyces cerevisiae*

### 3.2.5.1. Cultura de microrganismos

A levedura, *Sacharomyces cerevisiae* BY4741 (MATa his3D1 leu2D met15D ura3D; EUROSCARF, Germany), no nosso laboratório a levedura encontram-se armazenadas a -80 °C em meio de cultura com glicerol.

Na realização deste trabalho foi utilizado meio YEPD (1/3 de líquido para 2/3 de ar) de acordo com a formulação clássica do mesmo descrito por Atlas (2006), constituído por extrato de levedura (10 g/L) e peptona (20 g/L) dissolvidos em água ultra-pura e esterilizado pelo calor húmido, ao qual posteriormente foi adicionada glucose (20 g/L) esterilizada por filtração (filtro 0,2 µm), bem como volume adequado de solução aquosa de pentóxido de



vanádio. A preparação de meio YEPD sólido incluiu a adição de agar (20 g/L) antes da esterilização em autoclave.

O meio YEPD foi inoculado com *S. cerevisiae* BY4741 preservada a -80 °C e incubado durante 16 h em banho com agitação (150 rpm), termostaticado a 28 °C. Com esta cultura fresca inoculou-se meio YEPD, 1/3 de líquido para 2/3 de ar, e acompanhou-se o crescimento da cultura lendo a turbidez a 640 nm. Quando a cultura atingiu a fase exponencial média, 0,8 de turbidez a 640 nm, foi utilizada para inocular os meios YEPD e YEPD em presença de:  $V_2O_5$  (2 mM) ou  $V_2O_5$  (2 mM) + extrato de maçã (5 %), de forma a iniciar o ensaio com culturas a 0,8 de turbidez, incubadas, nas condições anteriormente descritas, durante 72 h. No final do tempo de cultura, as células foram recolhidas por centrifugação a 3000 g, durante 20 min a 4°C e lavadas em água bi-distilada estéril, ressuspensas em tampão fosfato (10 mM) pH 7,0 e desintegradas recorrendo a homogeneizador de ultra-sons (10 s 3 x 5 min; 0,1 kHz pulso). Os homogeneizados foram submetidos a centrifugação diferencial a 12000 g durante 20 recolhendo-se o sobrenadante pós-12000 g e resuspendendo o sedimento em tampão fosfato (10 mM) pH 7,0. As frações celulares obtidas foram repartidas em alíquotas e guardadas a -20 °C, para posterior determinação de conteúdos celulares e atividades enzimáticas.

A concentração (2 mM) do agente de stress, pentóxido de vanádio, utilizada para o delineamento deste estudo foi considerada tendo em conta os resultados obtidos previamente e que o caracterizam como um pró-oxidante (Gonçalves, 2010).

Nos ensaios de atividade biológica em levedura foi utilizado extrato de maçã Bravo de Esmolfe, *Golden Delicious* e *Starking*, obtido em frutos do primeiro tempo de colheita.

### **3.2.5.2.Determinação do peso seco**

Amostras de células crescidas na ausência ou na presença de pró e antioxidantes foram recolhidas após 72 horas. As amostras foram colocadas a secar em estufa a 80 °C, até atingirem peso constante.

### **3.2.5.3.Viabilidade celular**

A sobrevivência celular foi estimada pela determinação de unidades formadoras de colónias (cfu) em placas contendo meio YEPD as quais foram incubadas a 28 °C em estufa até não se observar o aparecimento de novas colónias.

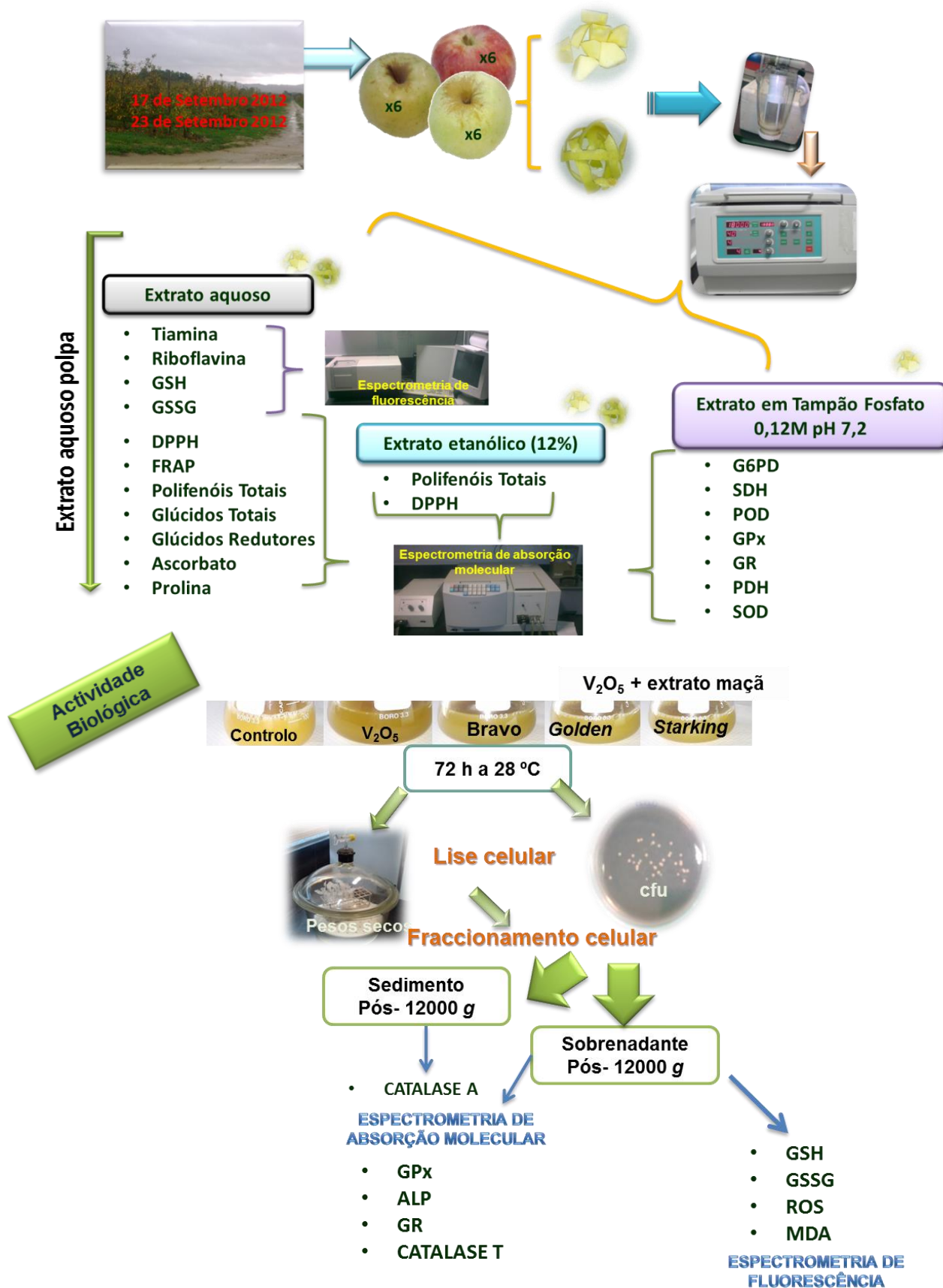
### **3.2.5.4.Preparação das frações pós-12000 g**

A preparação das frações celulares foi realizada seguindo o método proposto por Lake (1987). As células recolhidas de acordo com o descrito na seção 3.2.9.1. foram lavadas três vezes em água ultra-pura estéril. As células foram ressuspensas em 15 mL de tampão fosfato (10 mM), pH 7. Submeteu-se a suspensão celular, mantida a 4°C, a homogeneização

por ultra-sons (3 x 5min; 0,1; 1). Os lisados celulares foram a centrifugar a 12000 g, durante 20 min, a 4 °C. O sobrenadante obtido pós-12000 g foi guardado em alíquotas a -20 °C.

No sobrenadante pós-12000 g foi determinada a concentração de proteína, de acordo com o descrito na seção 3.2.3.5, de forma a permitir no cálculo da atividade enzimática específica.

### 3.3 Diagrama do Trabalho



### 3.4 Material

- Erlenmeyers
- Espátulas
- Filtros Millipore (0,2  $\mu$ )
- Frascos de vidro
- Gobelés
- Magnetos
- Micropipetas: P<sub>2</sub>, P<sub>10</sub>, P<sub>20</sub>, P<sub>100</sub>, P<sub>1000</sub>, P<sub>5000</sub> e respectivas pontas
- Microtubos
- Pipetas de Pasteur
- Pipetas graduadas
- Pompets
- Seringas
- Suportes
- Tubos de centrífuga
- Tubos de ensaio

### 3.5 Equipamento

- Analisador de imagens BioRad Gel Doc EQ BioRad com *software Quantity-one*
- Autoclave da marca Seleta, modelo microclave
- Balança analítica da marca Mettler, modelo AE 200
- Balança micro-analítica da marca Mettler Toledo, modelo AX 205
- Balança técnica da marca Mettler, modelo PJ 3000
- Banho termostaticado com agitação da marca Memmert, modelo 3200 R
- Bidestilador da marca Aquatron, modelo A 4D
- Espectrofluorímetro de feixe simples da marca Shimadzu, modelo RF-5001 PC
- Espectrofotómetro de feixe duplo da marca Hitachi, modelo U2001, com banho termostaticado e sistema de circulação de água da marca Grant
- Estufa de incubação da marca Kowell, modelo D2-1
- Homogeneizador de sonda de ultra-sons da marca Branson Sonifier, modelo 450
- Potenciómetro da marca Metrohm, modelo 691
- Supercentrífuga da marca Hermle, modelo Z323 K
- Vortex da marca Heidolph, modelo Reax 2000
- 

### 3.6 Reagentes

- Albumina do soro bovino, pró-análise, Sigma, St. Louis
- Acetato de sódio trihidratado, 99, 0-101,0%, Panreac, Barcelona
- Ascorbato, pró-análise, 99%, Fluka, St. Louis
- Ácido acético glacial, 99,5%, Panreac, Espanha
- Ácido clorídrico, pró-análise (d = 1,19) 37%, Merck, Darmstadt
- Ácido etilenodiaminotetracético, Sigma, St.Louis
- Ácido gálico, pró-análise, Sigma, St Louis
- Ácido orto-fosfórico, 85%, Merck, Darmstadt
- Ácido sulfúrico, 95-97%, Fuka, Suíça
- Ácido triobarbitúrico, pró-análise, 99%, Merck, Darmstadt
- Ácido tricloroacético, pró-análise, 99,5 %Merck Darmstadt
- Agar, 99,9 %, Merck, Darmstadt
- Batofenantrolina, 99%, Sigma, St. Louis
- N-butanol, 99%, Sigma,

- Carbonato de sódio monohidratado, 13,8%, Sigma, St. Louis
- Cloreto de Ferro (III) hexahidratado, pró-análise, Merck, Darmstadt
- Cloreto de sódio, 99,5%, Panreac, Barcelona
- Cloreto de nitrotetrazolio (azul), sigma-aldrich, Suíça
- 2,2-Difenil-1-picril-hidrazilo, Sigma, St. Louis
- Dihidrogenofosfato de potássio, pró-análise, 99,0 %, Merck, Darmstadt
- Dinucleótido de nicotinamida e adenina oxidado, (sal de sódio), pró-análise, 98,0 %, Sigma St. Louis
- Duodecilssulfato de sódio, Sigma, St. Louis
- Sigma, St. Louis
- Extrato de levedura, 99,0 %, Sigma, St. Louis
- Etanol, pró-análise, Panreac, Barcelona
- p-fenilenodiamina, Sigma, St. Louis
- Fenol, 90%, Riedel-de Haen, Alemanha
- Ferricianeto de otássio, pró-análise, 99%, Merck, Darmstadt
- Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina oxidado, (sal de sódio), pró-análise, 98,0 %, Sigma St. Louis
- Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido, (sal de sódio), pró-análise, 98,0 %, Sigma St. Louis
- Glucose, 99,9 %, Merck, Darmstadt
- Glucose-6-fosfato desidrogenase, Sigma, St.Louis
- Glutationo, pró-análise, 98,0 %, Sigma, St. Louis
- Glutationo dissulfureto, pró-análise, 98,0%, Sigma, St. Louis
- Glutationo redutase, Sigma, St.Louis
- Hidrogenofosfato dipotássio, 99 %, Pronalab, Lisboa
- Hidróxido de sódio anidro, pró-análise, 99 %, Merck, Darmstadt
- L- Prolina, %, Sigma, St. Louis
- Metanol, pró-análise, Merck, Darmstadt
- Peróxido de hidrogénio, pró-análise, 30 %, Riedel-de Haën, Germany
- Pirocatecol, 99%, Sigma, St. Louis
- Permanganato de potássio, 99%, Fluka, Suíça
- Reagente fenólico, segundo Folin-Ciocalteu, pró-análise, Sigma, St. Louis
- Sulfato de cobre, pró-análise, 99,5 -102,9 %, Panreac, Barcelona
- t-butil hidroperóxido, Sigma, St. Louis
- Tartarato de sódio e potássio tetra-hidratado, pró-análise, 99,9 %, Merck, Darmstadt
- 2, 4,6 -Tris (2-piridil)-s-triazina, 99 %, Sigma, St. Louis
- Trolox metil éter, 98%, Sigma, St. Louis
- Peptona, 99,0 %, Sigma, St. Louis
- Xantina, 99%, Sigma, St. Louis
- Xantina oxidase, Sigma, St. Louis



## 4. Resultados e Discussão

### 4.1 Valor nutritivo de *Malus domestica* em diferentes tempos de colheita

Os critérios de base biológica que determinam a qualidade de um determinado alimento assentam primariamente nas suas características organolépticas e nutricionais, particularmente os constituintes dos frutos que são importantes para uma dieta saudável, relacionado com processos biológicos que envolvem o metabolismo.

Alguns frutos, como por exemplo o tomate, as bananas, as laranjas e as maçãs são amplamente consumidos de forma ubíqua por todo o mundo enquanto outros, como azeitonas e amoras são de consumo mais localizado. Contudo, nas últimas décadas o aumento das vias de comunicação tem facilitado o consumo desses frutos que eram desconhecidos para diversas populações do globo (Zhang, 2010).

No entanto, embora o consumo de frutos frescos *per capita* nos países ocidentais manifeste uma tendência crescente, a frequência com que acontece é inferior ao que é recomendado numa dieta saudável e variada com hábitos e disponibilidade garantida.

Os frutos são uma fonte natural de vitaminas, água, ácidos orgânicos, lípidos, glícidos, proteínas, fibras, antioxidantes e minerais inorgânicos. A concentração destas substâncias varia entre espécies e cultivares e pode ser influenciada por fatores ambientais, práticas agrícolas e manipulação pós-colheita.

Para além das vitaminas A e C a quantidade de outros constituintes dos frutos como os fenóis descritos na seção 4.2 exibem propriedades antioxidantes de importância capital para a saúde humana. As vitaminas são moléculas orgânicas essenciais em quantidade traço podendo ser agrupadas em seis categorias: A, complexo B, C, D, E e K. Em geral os frutos frescos possuem quantidades significativas das vitaminas A, B, C e E (Ahmed, 2009).

As vitaminas do complexo B como por exemplo B1 ou tiamina e B2 ou riboflavina pertencem ao grupo dos compostos hidossolúveis que contribuem para o bem-estar humano, suportando o crescimento celular e o metabolismo, protegendo a pele e o tónus muscular, bem como as funções do sistema imunitário, sendo a sua origem natural maioritariamente detetada em frutos (Soares de Arruda, 2013).

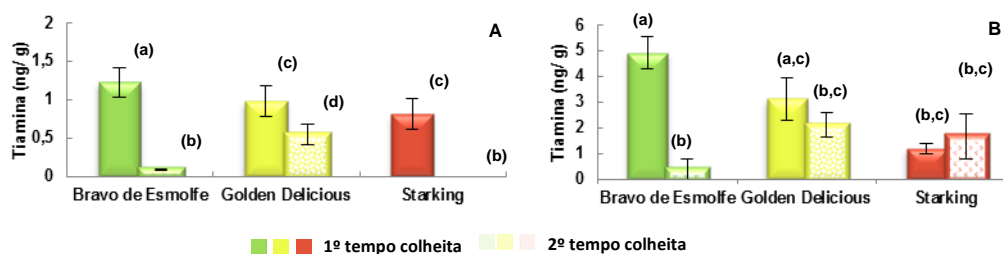
A vitamina C ou ascorbato é uma latona hidossolúvel fortemente antioxidante. Nos seres humanos atua como cofator enzimático de reações biossintéticas sendo substrato do ascorbato peroxidase e comportando-se como doadora de eletrões de alguns enzimas. A vitamina C na forma de sumos frescos foi utilizada na prevenção do escorbuto antes de ser purificada em 1932. Contudo pacientes sofrendo de stress oxidativo, em particular os que estão relacionados com doenças cardiovasculares, hipertensão, síndromas respiratórios e diabetes exibem níveis de ascorbato no plasma muito inferiores aos dos indivíduos

saudáveis, pelo que urge detetar e caracterizar a composição em vitaminas e nutrientes de frutos para consumo no mercado.

O nível de glúcidos e ácidos orgânicos são fatores igualmente importantes no condicionamento do paladar, sendo o conteúdo relativo destes constituintes dependente da atividade e da interação entre o metabolismo glicídico e carboxílico. Durante o período de maturação da maçã ocorrem interações metabólicas ainda pouco conhecidas mas de importância agrícola fundamental.

A acumulação de glúcidos durante a maturação da maçã depende maioritariamente da fixação do carbono na forma de sorbitol e sacarose pelas folhas fotossintéticas, que se acumulam na forma de frutose, glicose, sacarose, ácido málico e amido. Após a colheita, o amido dos frutos é quase totalmente convertido em sacarose. Este processo é característico da maçã onde a frutose é produzida em abundância uma vez que a quantidade de glicose formada é, em termos relativos, inferior à de outros frutos, devido à conversão do sorbitol em frutose pela SDH. Uma vez que os glúcidos formados na fotossíntese da maçã correspondem a 70% de sorbitol e 30% de sacarose, a frutose é consequentemente a principal hexose que se acumula neste fruto, pelo que a caracterização glicídica dos frutos constitui uma importante informação nutricional que pode incrementar o seu valor funcional (Li, 2012).

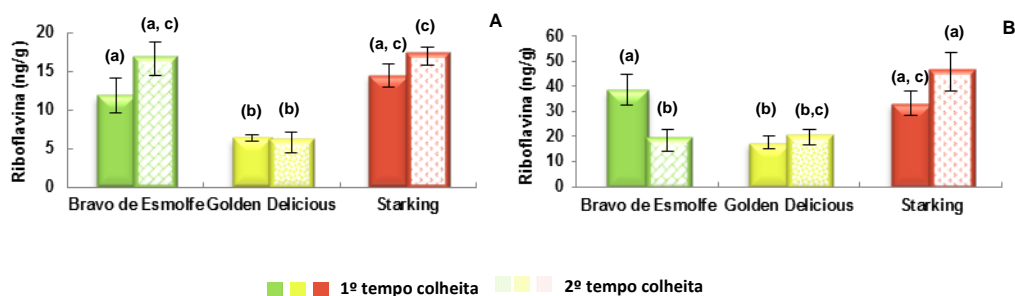
A figura 4.1.1 representa o nível de tiamina nos extratos aquosos da polpa (A) e da pele (B) de maçã. Pela figura podemos observar que as maçãs *Golden Delicious* e *Starking* do primeiro tempo de colheita, possuíam menor concentração desta vitamina na polpa enquanto que na pele as maçãs *Bravo de Esmolfe* possuem maior quantidade de tiamina do que a maçã *Starking* ( $p < 0,05$ ). As referidas figuras mostram ainda que ocorreu um decréscimo significativo do conteúdo em tiamina na polpa das três cultivares no segundo tempo de colheita ( $p < 0,05$ ). O mesmo efeito foi apenas observado na pele das maçãs *Bravo de Esmolfe* ( $p < 0,05$ ). Convém ainda referir que em termos absolutos se detetou maior concentração de tiamina na pele de qualquer das cultivares e em qualquer dos tempos de colheita.



**Figura 4.1.1.** Conteúdo em tiamina na polpa (A) e na pele (B) de maçã *Bravo de Esmolfe*, *Starking* e *Golden Delicious* em dois tempos de colheita. Os resultados representam a média aritmética de seis experiências independentes  $\pm$  desvio padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

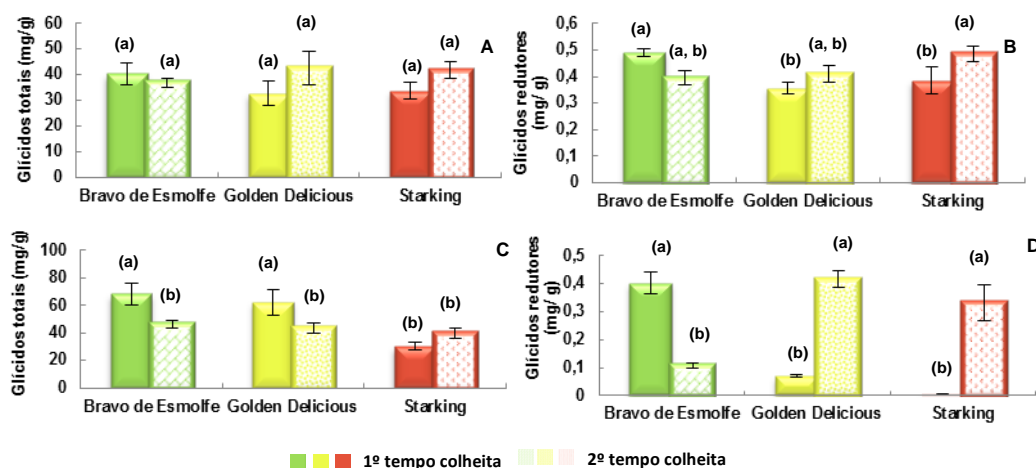


O conteúdo em riboflavina, outra vitamina do complexo B, encontra-se registado na figura 4.1.2 onde pode observar-se que os níveis de vitamina B2 eram menores na polpa (A) e na pele (B) da variedade *Golden Delicious* do primeiro tempo de colheita. Por outro lado, o conteúdo em riboflavina apenas sofreu um decréscimo significativo na pele da cultivar Bravo de Esmolfe no segundo tempo de colheita ( $p < 0,05$ ). A abundância de riboflavina segue o mesmo perfil do detetado para a outra vitamina do complexo B sendo muito superior na pele de qualquer das cultivares em qualquer tempo de colheita.



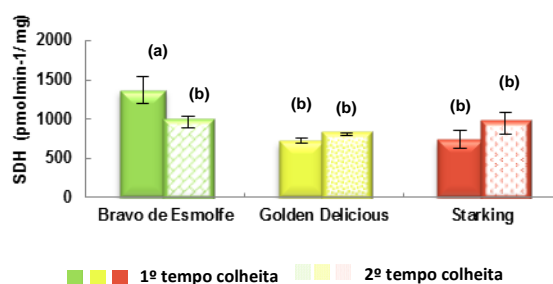
**Figura 4.1.2.** Conteúdo em riboflavina na polpa (A) e na pele (B) de maçã Bravo de Esmolfe, *Starking* e *Golden Delicious* em dois tempos de colheita. Os resultados representam a média aritmética de seis experiências independentes  $\pm$  desvio padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

No que diz respeito ao conteúdo glicídico a figura 4.1.3 exhibe os níveis totais de glúcidos detetados em cada variedade estudada. Uma primeira aproximação revela-nos que a proporção de glúcidos redutores nas amostras analisadas é de aproximadamente 1/100 dos glúcidos totais (Calu, 2009). A figura 4.1.3A mostra que não existem diferenças significativas entre os glúcidos totais da polpa de qualquer das variedades de maçã. No entanto, na pele a quantidade de glúcidos totais das variedades Bravo de Esmolfe e *Golden Delicious*, do primeiro tempo de colheita, é significativamente superior à detetada em maçãs *Starking* (Fig. 4.1.3C). Contudo, nas variedades Bravo de Esmolfe e *Golden Delicious* detetou-se uma diminuição significativa do conteúdo em glúcidos totais da pele dos frutos do segundo tempo de colheita (Fig. 4.1.3C). Relativamente aos glúcidos redutores (Fig. 4.1.3D) foi na variedade Bravo de Esmolfe que se observou um valor significativamente superior no primeiro tempo de colheita. A composição glicídica da polpa não sofreu alterações significativas nas maçãs Bravo de Esmolfe e *Golden Delicious* do segundo tempo de colheita (Fig. 4.1.3A e B), contudo observou-se um aumento significativo destes materiais na polpa de maçã *Starking* do segundo tempo de colheita ( $p < 0,05$ ). No que diz respeito à pele, a figura 4.1.3D mostra que era a variedade Bravo de Esmolfe que possuía maior quantidade de glúcidos redutores no primeiro tempo de colheita. No entanto, ocorreu um aumento significativo deste conteúdo nas variedades *Golden Delicious* e *Starking* do segundo tempo de colheita ( $p < 0,01$ ), enquanto na Bravo de Esmolfe ocorreu um decréscimo significativo ( $p < 0,01$ ) (Fig. 4.1.3D).



**Figura 4.1.3.** Conteúdo em glícidos totais na polpa (A) e pele (C) e redutores na polpa (B) e pele (D) de maçã *Bravo de Esmolfe*, *Starking* e *Golden Delicious* em dois tempos de colheita. Os resultados representam a média aritmética de seis experiências independentes  $\pm$  desvio padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes de A a C ( $p < 0,05$ ) e ( $p < 0,01$ ) em D.

Por fim, a figura 4.1.4 representa o nível de atividade sorbitol desidrogenase presente em cada cultivar. A referida figura mostra que a variedade *Bravo de Esmolfe* exibe atividade catalítica SDH significativamente superior à das outras cultivares no primeiro tempo de colheita, no entanto, esta atividade catalítica diminuiu significativamente em maçãs do segundo tempo de colheita para valores próximos dos detetados nas outras cultivares ( $p < 0,05$ ) (Li, 2012). Este resultado permite-nos inferir que a variedade *Bravo de Esmolfe* do primeiro tempo de colheita poderá exibir um sabor adocicado maioritariamente assegurado pela maior composição em frutose.



**Figura 4.1.4.** Atividade sorbitol desidrogenase de maçã *Bravo de Esmolfe*, *Starking* e *Golden Delicious* em dois tempos de colheita. Os resultados representam a média aritmética de seis experiências independentes  $\pm$  desvio padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

## 4.2 Capacidade antioxidante de *Malus domestica* em diferentes tempos de colheita

Atualmente, o interesse em descobrir dietas saudáveis tem aumentado acentuadamente, respeitando as exigências dos consumidores relativamente aos alimentos disponíveis do mercado, não só em termos nutritivos mas também em termos de propriedades benéficas para a saúde, entre as quais se destaca a capacidade antioxidante dos alimentos (Ceymann, 2012; Bonatto, 2007; Cipak, 2007).

Por outro lado, o fator chave que contribui para aumentar o consumo e consequentemente o valor de mercado de um determinado produto alimentar ocorre também intimamente relacionado com as propriedades benéficas para a saúde, pelo que a caracterização dos alimentos como os frutos, em termos de conteúdo em ascorbato, fenóis, glutatióno e aminoácidos como a prolina, bem como da capacidade para capturar espécies reativas de oxigénio (DPPH) ou antioxidante mediada pelo ferro (FRAP) e glutatióno (GSH+GSSG; GSH/GSSG), entre outras, é cada vez mais exigido como critério de qualidade para a colocação de produtos no mercado europeu. A valorização de produtos nacionais e em particular de cultivares autótones do país contribuirá seriamente para o progresso da agricultura e da sua contribuição para a economia nacional (Iacopini, 2010; Lata, 2008; Prior, 2005).

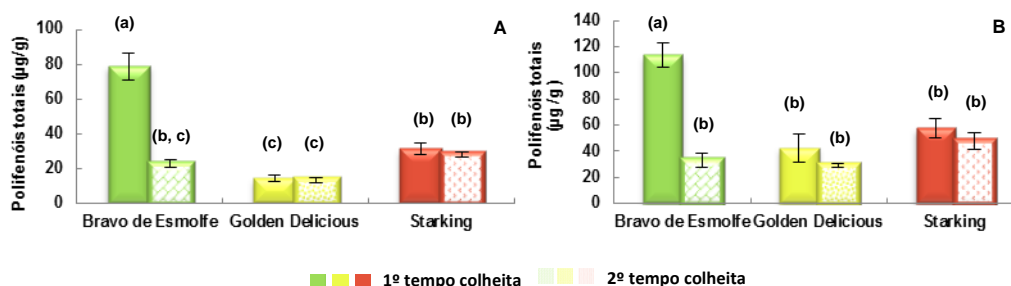
Para além da capacidade antioxidante, alguns compostos bioativos dos alimentos exibem ainda propriedades organolépticas e de conservação essenciais para promover o seu valor de mercado.

Considerando os fatores descritos anteriormente, a segunda tarefa proposta para este trabalho procurou assim caracterizar três variedades de *Malus domestica*, Bravo de Esmolfe, *Golden Delicious* e *Starking* em termos de composição e propriedades antioxidantes dos frutos em diferentes tempos de colheita, tendo em vista a otimização dos processos de conservação que maximizem propriedades benéficas para o homem.

### 4.2.1 Polpa

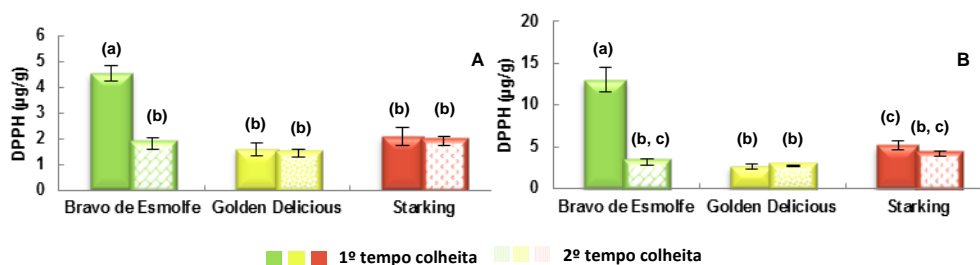
A figura 4.2.1A compara a composição em fenóis da polpa de três variedades de maçã revelando que a Bravo de Esmolfe é aquela que exhibe maior quantidade no primeiro tempo de colheita, valor que surge significativamente diminuído no segundo tempo de colheita ( $p < 0,05$ ). Curiosamente as variedades que exibiam valores significativamente menores no início da colheita, *Golden Delicious* e *Starking*, não sofreram alterações significativas ao longo do tempo. Convém ainda destacar que foi no extrato aquoso da polpa da variedade *Golden Delicious* que se detetou menor quantidade de fenóis ( $p < 0,05$ ) (Zhang, 2012). A figura 4.2.1B mostra que o conteúdo fenólico da polpa das três variedades do

extrato etanólico é superior ao detetado no extrato aquoso, sendo o perfil de concentração determinado nos dois tempos de colheita idêntico para as três variedades, observando-se apenas diferenças entre tempos de colheita para a Bravo de Esmolfe. No entanto, o conteúdo fenólico no extrato etanólico (B) de *Golden Delicious* e *Starking* não exibiu diferenças significativas ( $p < 0,01$ ) tal como no extrato aquoso (A).



**Figura 4.2.1.** Conteúdo em polifenóis totais no extrato aquoso (A) etanólico (B) de polpa de maçã Bravo de Esmolfe, *Starking* e *Golden Delicious* em dois tempos de colheita. Os resultados representam a média aritmética de seis experiências independentes  $\pm$  desvio padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

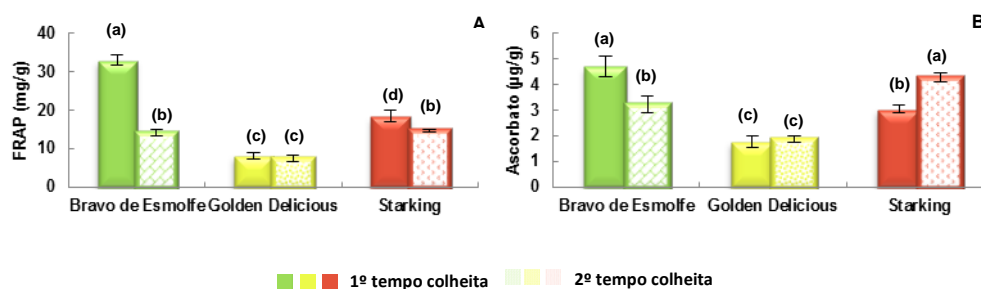
A figura 4.2.2 representa a capacidade para capturar ROS estimada pelo radical sintético DPPH, onde pode observar-se uma correlação estreita entre esta propriedade e o conteúdo em fenóis tanto no extrato aquoso (A) como no etanólico (B) da polpa (0,828-0,915), isto é, a variedade Bravo de Esmolfe é aquela que exhibe maior capacidade antioxidante no primeiro tempo de colheita que decresce significativamente para valores idênticos aos das outras variedades, no segundo tempo de colheita. É também interessante destacar que o extrato etanólico foi aquele que exibiu maior capacidade antioxidante detetada pelo DPPH, também altamente correlacionado com o conteúdo em fenóis (0,985).



**Figura 4.2.2** Capacidade antioxidante medida pelo DPPH no extrato aquoso (A) etanólico (B) de polpa de maçã Bravo de Esmolfe, *Starking* e *Golden Delicious* em dois tempos de colheita. Os resultados representam a média aritmética de seis experiências independentes  $\pm$  desvio padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

A partir da figura 4.2.3A pode observar-se que era a variedade Bravo de Esmolfe aquela que dispunha de maior capacidade antioxidante mediada pelo ferro e detetada pelo método do FRAP, no primeiro tempo de colheita. Todavia, esse valor diminuiu significativamente para valores próximos da variedade *Starking* no segundo tempo de colheita. A mesma figura revela ainda que a variedade *Golden Delicious* foi aquela que exibiu menor capacidade antioxidante estimada pelo FRAP, sendo significativamente inferior à que foi detetada em maçãs *Starking*.

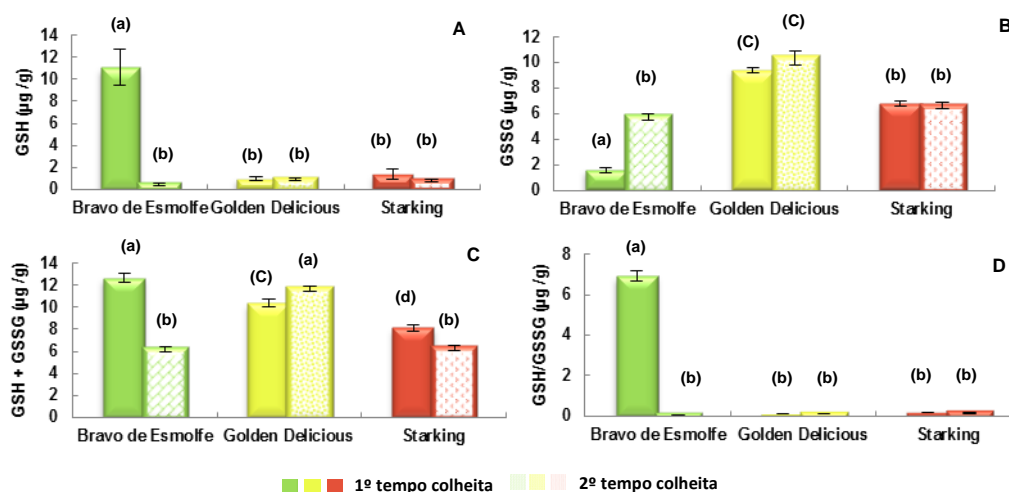
A figura 4.2.3B revela que os níveis de ascorbato assumiram, no primeiro tempo de colheita, valores mais elevados na variedade Bravo de Esmolfe e menores na variedade *Golden Delicious*, observando-se tal como em situações descritas anteriormente um decréscimo significativo do conteúdo desta vitamina no segundo tempo de colheita da variedade Bravo de Esmolfe, perfil inverso ao detetado na variedade *Starking* que aumentou e na variedade *Golden Delicious* que não foi afetado pelo tempo de colheita.



**Figura 4.2.3** Capacidade antioxidante medida pelo FRAP (A) e pelo ascorbato (B) no extrato aquoso de polpa de maçã Bravo de Esmolfe, *Starking* e *Golden Delicious* em dois tempos de colheita. Os resultados representam a média aritmética de seis experiências independentes  $\pm$  desvio padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

A figura 4.2.4A mostra que o conteúdo em glutatono e a capacidade antioxidante mediada pelo tripéptido era significativamente superior ( $p < 0,01$ ) em maçãs Bravo de Esmolfe do primeiro tempo de colheita, valores que diminuíram significativamente no segundo tempo de colheita, ficando muito próximos dos valores detetados nas variedades *Golden Delicious* e *Starking* que não diferem entre si nem variaram com o tempo. Por outro lado, o conteúdo em dissulfureto de glutatono Fig.4.2.4B era significativamente inferior na variedade Bravo de Esmolfe do primeiro tempo de colheita, tendo aumentado significativamente no segundo tempo de colheita para valores próximos dos que foram determinados na variedade *Starking* ( $p < 0,01$ ). Convém ainda referir que o valor deste parâmetro era significativamente mais elevado na variedade *Golden Delicious*, não tendo sofrendo alterações ao longo do período de colheita.

Na figura 4.2.4C detetaram-se valores mais elevados do conteúdo em tióis totais não proteicos na variedade Bravo de Esmolfe ao primeiro tempo de colheita enquanto que no segundo tempo de colheita foi a variedade *Golden Delicious* que exibiu valores mais elevados. No entanto, ao longo do período de colheita foi a *Golden Delicious* que exibiu valores mais estáveis e próximos do valor máximo detetado nas três cultivares. Estes resultados explicam a baixa capacidade antioxidante estimada pela razão GSH/GSSG (Fig. 4.2.4D).

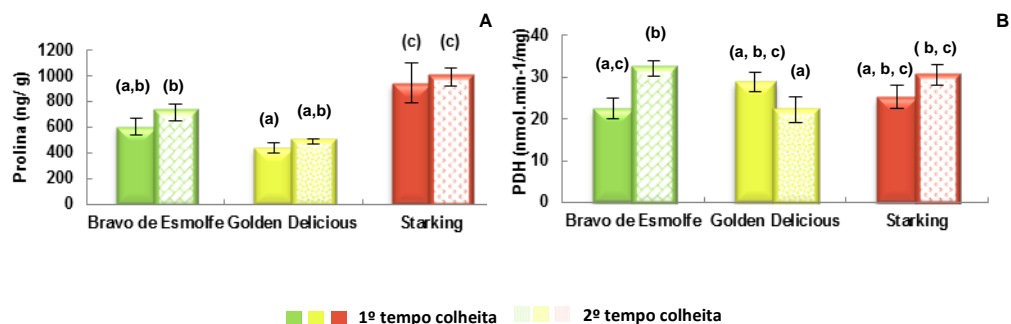


**Figura 4.2.4.** Conteúdo em glutatono (A), dissulfureto de glutatono (B), tióis totais não proteicos (C) e razão GSH/GSSG (D) no extrato aquoso de polpa de maçã Bravo de Esmolfe, *Starking* e *Golden Delicious* em dois tempos de colheita. Os resultados representam a média aritmética de seis experiências independentes  $\pm$  desvio padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,01$ ).

A figura 4.2.5 revela a composição em prolina (A) e PDH (B) na polpa das três variedades de maçã. Assim, no que diz respeito à prolina os níveis mais elevados no primeiro tempo de colheita foram detetados na variedade *Starking* ( $p < 0,05$ ), não se observando diferenças significativas entre as variedades Bravo de Esmolfe e *Golden Delicious*. Por outro lado, não foram detetadas alterações significativas entre o primeiro e segundo tempo de colheita em cada variedade. Relativamente à atividade PDH (Fig. 4.2.5B) não foram detetadas diferenças significativas no primeiro tempo de colheita.

No entanto na variedade Bravo de Esmolfe ocorreu um aumento com significado ( $p < 0,05$ ) entre o primeiro e segundo tempo de colheita. Estes resultados sugerem que neste caso particular a cultivar Bravo de Esmolfe poderá ser aquela que apresenta menor capacidade de resposta ao stress, no primeiro tempo de colheita, via catabolismo da prolina e consequente incremento de ROS, ATP e pirrolina-5-carboxilato (Lehman, 2010). É provável que a colheita precoce desta variedade possa contribuir para uma melhor

conservação da mesma, uma vez que estão menos ativos processos de morte celular e de ativação metabólica.

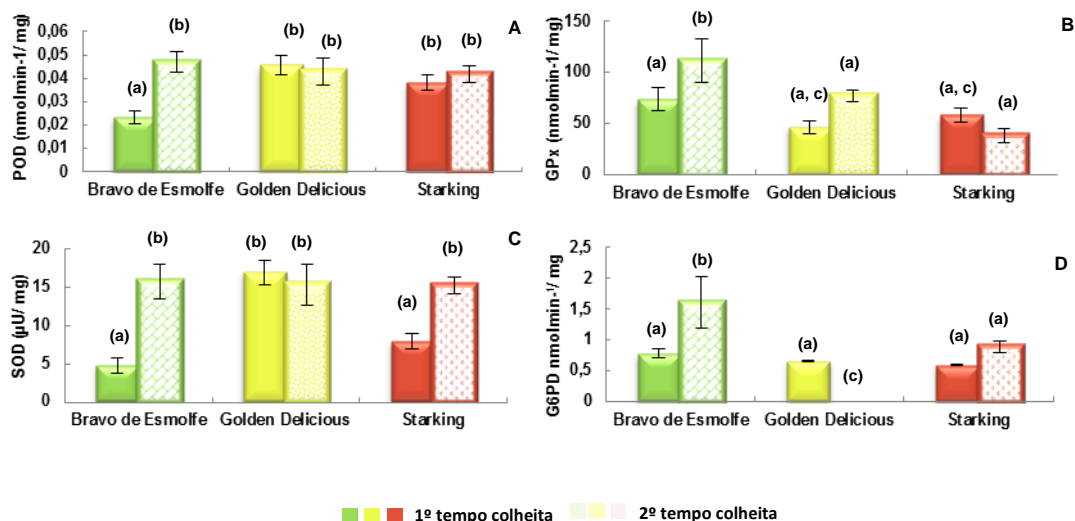


**Figura 4.2.5** Conteúdo em prolina (A) e prolina desidrogenase (B) no extrato aquoso de polpa de maçã Bravo de Esmolfe, *Starking* e *Golden Delicious* em dois tempos de colheita. Os resultados representam a média aritmética de seis experiências independentes  $\pm$  desvio padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

A figura 4.2.6A revela que as variedades *Golden Delicious* e *Starking* possuem os níveis mais elevados da atividade catalítica peroxidase no primeiro tempo de colheita ( $p < 0,05$ ), contudo ao segundo tempo de colheita a variedade Bravo de Esmolfe atinge valores de atividade idênticos aos das outras variedades que não sofreram qualquer alteração com o tempo de colheita. Os níveis funcionais da atividade glutatono peroxidase dependente do selênio (Fig. 4.2.6B) não diferem entre variedades no primeiro tempo de colheita. Contudo, as maçãs Bravo de Esmolfe exibem níveis desta atividade catalítica significativamente superiores aos das maçãs *Golden Delicious* e *Starking* ao segundo tempo de colheita.

Relativamente à atividade enzimática superóxido dismutase (Fig. 4.2.6C) pôde-se observar que no primeiro tempo de colheita era a variedade *Golden Delicious* que exibia maior atividade catalítica ( $p < 0,01$ ). No entanto, no segundo tempo de colheita observou-se um aumento significativo da SOD para valores próximos dos detetados em *Golden Delicious* nas variedades Bravo de Esmolfe e *Starking*. A figura 4.2.6D representa a atividade glucose-6-fosfato desidrogenase, disponibilizadora de equivalentes redutores sob a forma de NADPH, nas três variedades de maçã revelando que no primeiro tempo de colheita não existem diferenças significativas desta atividade catalítica nas três variedades. Contudo, ao segundo tempo de colheita detetou-se um incremento significativo da atividade G6PD nas maçãs Bravo de Esmolfe e um decréscimo significativo nas maçãs *Golden Delicious* ( $p < 0,05$ ).

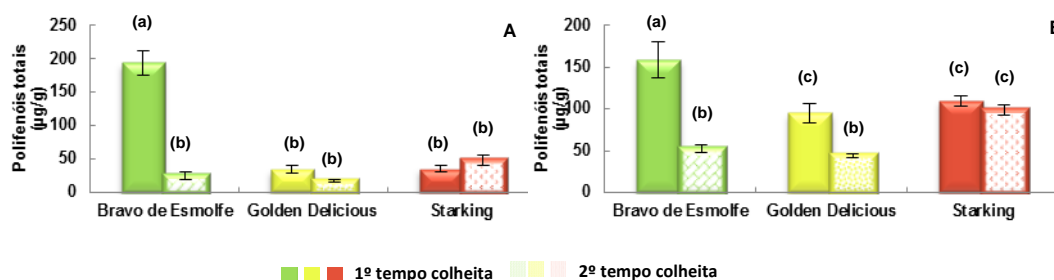
Em termos de conservação é possível que os níveis elevados de POD, GPx, SOD e G6PD detetados na variedade Bravo de Esmolfe, no segundo tempo de colheita, por vezes superiores aos das variedades *Golden Delicious* e *Starking* possam contribuir para uma melhor preservação destes frutos contra danos celulares, ampliando assim o seu período de armazenamento.



**Figura 4.2.6** Atividade catalítica de enzimas antioxidantes POD (A), GPx (B), SOD (C) e G6PD (D) no extrato aquoso de polpa de maçã Bravo de Esmolfe, Starking e Golden Delicious em dois tempos de colheita. Os resultados representam a média aritmética de seis experiências independentes  $\pm$  desvio padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

## 4.2.2 Pele

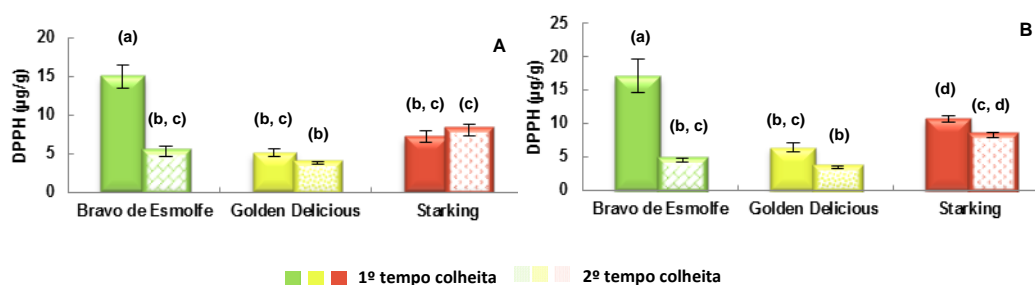
No subcapítulo 4.2.1 apresentou-se e discutiu-se as propriedades antioxidantes presentes na polpa das três variedades de maçã. Neste subcapítulo, discutir-se-á a composição e propriedades antioxidantes detetadas na pele das três variedades de *Malus domestica*. Deste modo, a composição fenólica do extrato aquoso (Fig. 4.2.7A) da pele de maçãs Bravo de Esmolfe no primeiro tempo de colheita revelou-se significativamente mais elevada no primeiro tempo de colheita, no entanto ocorreu um decréscimo significativo nos frutos desta variedade ao segundo tempo de colheita. Perfil de resposta idêntico foi detetado para o conteúdo fenólico do extrato etanólico da pele de maçãs Bravo de Esmolfe e *Golden Delicious* (Fig. 4.2.7B). Curiosamente a composição fenólica em maçãs *Starking* não variou com o tempo de colheita.



**Figura 4.2.7** Conteúdo em polifenóis totais no extrato aquoso (A) etanólico (B) de pele de maçã Bravo de Esmolfe, *Starking* e *Golden Delicious* em dois tempos de colheita. Os resultados representam a média aritmética de seis experiências independentes  $\pm$  desvio padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

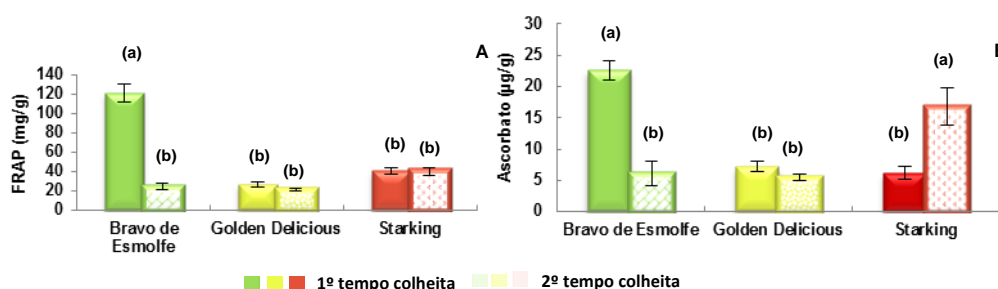


Quando se avaliou a capacidade antioxidante detetada pelo DPPH observou-se uma correlação estreita entre esta propriedade e o conteúdo em fenóis quer do extrato aquoso quer do extrato etanólico (Fig. 4.2.8A e B), continuando a ser as maçãs Bravo de Esmolfe do primeiro tempo de colheita aquelas que exibiam valor significativamente mais elevado. Tal como observado no conteúdo em fenóis, detetou-se uma queda significativa da capacidade antioxidante medida pelo DPPH no extrato aquoso da pele de maçã Bravo de Esmolfe do segundo tempo de colheita ( $p < 0,01$ ).



**Figura 4.2.8** Capacidade antioxidante medida pelo DPPH no extrato aquoso (A) etanólico (B) de pele de maçã Bravo de Esmolfe, *Starking* e *Golden Delicious* em diferentes tempos de colheita. Os resultados representam a média aritmética de seis experiências independentes  $\pm$  desvio padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,01$ ).

Avaliou-se ainda a capacidade antioxidante do ferro medida pelo método FRAP (Fig. 4.2.9A) e o conteúdo em ascorbato (Fig. 4.2.9B) do extrato aquoso das três variedades de maçã. As figuras revelam que a capacidade antioxidante mediada pelo ferro e os níveis de ascorbato eram significativamente superiores no extrato aquoso de maçãs Bravo de Esmolfe do primeiro tempo de colheita. Também nesta variedade se detetou um decréscimo significativo para níveis próximos das maçãs *Golden Delicious* e *Starking* no segundo tempo de colheita, não se tendo detetado diferenças significativas entre a capacidade antioxidante do ferro nestas duas últimas variedades em qualquer dos tempos de colheita e apenas ter-se observado um nível significativamente mais elevado do conteúdo em ascorbato de maçãs *Starking* do segundo tempo de colheita ( $p < 0,01$ ).



**Figura 4.2.9** Capacidade antioxidante medida pelo FRAP (A) e pelo ascorbato (B) no extrato aquoso de pele de maçã Bravo de Esmolfe, *Starking* e *Golden Delicious* em diferentes tempos de colheita. Os resultados representam a média aritmética de seis experiências independentes  $\pm$  desvio padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

### 4.3 Atividade biológica de extrato aquoso de polpa de *Malus domestica*

O vanádio é um metal de transição que pode ocorrer em vários estados de oxidação, desde -1 a +5, sendo o estado pentavalente considerado o mais estável mas também o mais tóxico. A principal fonte de contaminação pelo vanádio é a queima de combustíveis fósseis e a indústria siderúrgica onde é utilizado como endurecedor de ligas metálicas (Rondini, 2010; Gao, 2002). No interior celular o Vanádio (V) reage com  $H_2O_2$  para gerar radical hidroxilo por reações tipo Fenton, sendo por isso descrito na literatura como gerador de danos celulares devido à sua elevada capacidade oxidante (Valko, 2005; Cortizo, 2000).

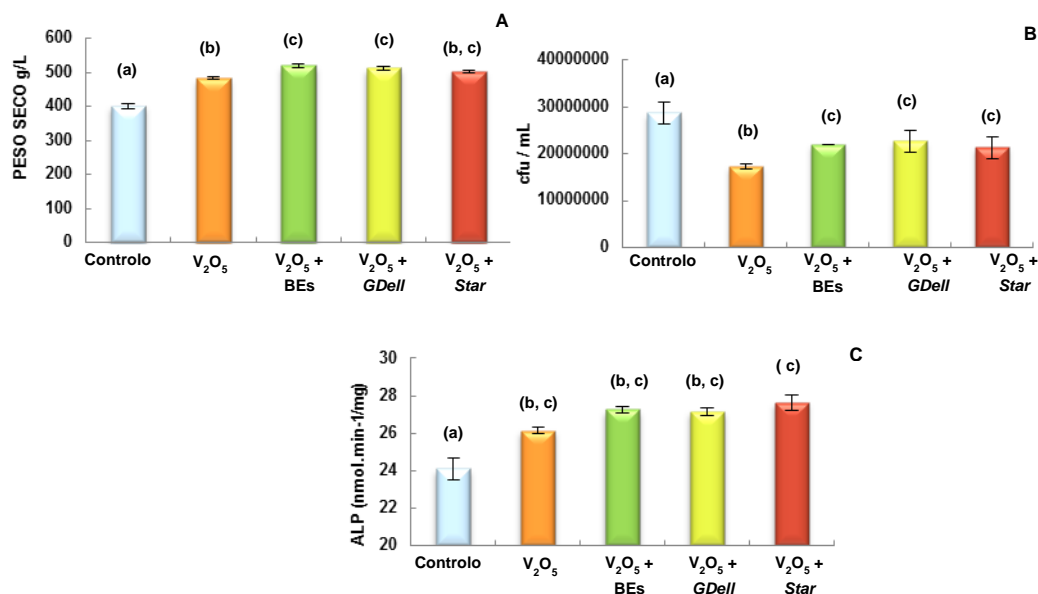
A *S.cerevisiae* BY4741 pertencente à coleção EUROSCARF, é uma levedura comercial cujo genoma se encontra sequenciado e que tem sido amplamente utilizada em estudos de stress, por expressar sistemas enzimáticos de resposta antioxidante que exibem elevada homologia sequencial com os de humanos (Karathia, 2011; Ilkner, 2005; Mager, 2005; Game, 2002; Sherman, 2002; Daum, 2000).

Por esse motivo este trabalho teve também como objetivo avaliar a resposta desta levedura ao pentóxido de vanádio, quando crescida na presença de extratos aquosos de polpa de maçã das variedades Bravo de Esmolfe, *Golden Delicious* e *Starking*, do primeiro tempo de colheita (17/09/2012) de pomares da Beira Alta, Portugal.

Os resultados obtidos mostram que culturas de *S.cerevisiae* BY4741 crescidas na presença de  $V_2O_5$  (2 mM) produziram maior quantidade de biomassa do que as crescidas em meio YEPD, perfil de resposta que foi significativamente acentuado ( $p < 0,05$ ) quando no meio de cultura estavam presentes, para além do pentóxido de vanádio, extrato aquoso de polpa de Bravo de Esmolfe e *Golden Delicious* cujo peso seco foi superior ao determinado em células apenas crescidas na presença do composto de vanádio (Fig. 4.3.1).

Contudo, observou-se um decréscimo significativo da quantidade de células viáveis em presença de pentóxido de vanádio, 39 % inferior ao controlo (Fig. 4.3.1B), resposta que parece ter sido revertida em presença de qualquer dos extratos de maçã, onde se observou um aumentando significativo ( $p < 0,05$ ) da quantidade de cfus de 27, 31 e 23 %, relativamente as culturas apenas crescidas na presença do composto de vanádio.

Na figura 4.3.1C observou-se um perfil de resposta idêntico ao do peso seco para a atividade fosfatase alcalina confirmando-se que a presença de vanádio (V) no meio de cultura induziu crescimento celular detetável, na fase inicial da cultura, responsável pela quantidade de biomassa produzida, que tendencialmente diminuiu à medida que progredia para a fase estacionária. Face aos resultados obtidos procurou-se encontrar uma explicação com base em marcadores de resposta antioxidante não enzimáticos e enzimáticos para a perda de viabilidade celular ao longo do tempo.

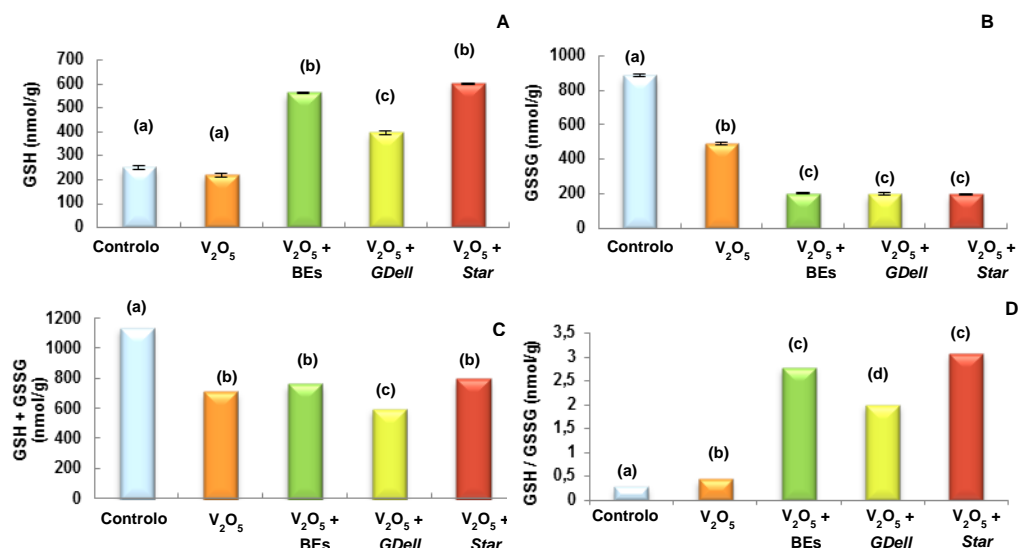


**Figura 4.3.1** Peso seco (A), cfu (B) e atividade ALP (C) de células de *S. cerevisiae* BY4741, crescidas em meio YEPD na ausência e na presença de pentóxido de vanádio (2 mM), assim como na presença de pentóxido de vanádio (2 mM) e extrato de maçã (5 %). Os resultados representam a média de seis experiências independentes  $\pm$  desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,01$ ).

A figura 4.3.2A mostra que a presença de vanádio no meio de cultura não afetou significativamente o conteúdo intracelular do tripéptido glutationo contrariamente ao que foi observado quando estavam presentes, para além do  $V_2O_5$  (2 mM), os extratos aquosos de cada cultivar de maçã. No que diz respeito ao conteúdo em dissulfureto de glutationo (GSSG) (Fig. 4.3.2B) observou-se uma queda significativa (44 %) deste derivado em células expostas ao vanádio que foi acentuada pela presença de qualquer dos extratos aquosos das maçãs ( $\approx 78$  %), assim crê-se que a homeostase do glutationo foi perturbada quer pela presença de vanádio quer pela exposição aos extratos de maçã (Lata, 2005).

Quando se comparou o conteúdo em tióis totais não-proteicos (Fig. 4.3.2C) em cada situação observou-se um decréscimo significativo deste parâmetro em todas as culturas em que estava presente o pentóxido de vanádio (2mM). No entanto, em termos percentuais a referida queda foi mais acentuada na cultura exposta ao pentóxido de vanádio e ao extrato aquoso de maçã *Golden Delicious*.

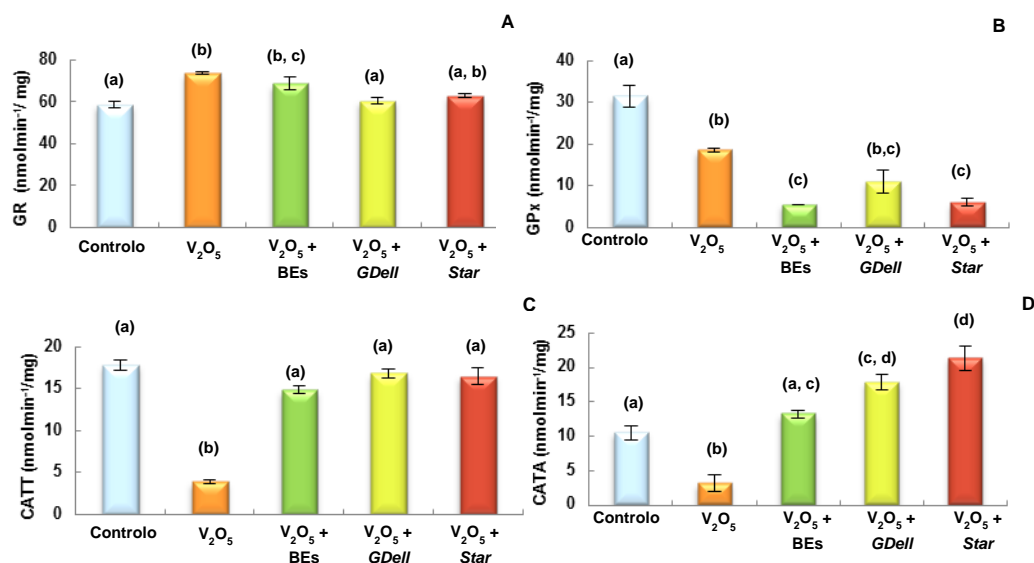
Este tipo de resposta permite inferir que a estabilidade do ambiente redutor da célula assegurada pelo glutationo pode ter sido comprometida pela disponibilidade do tripéptido (Fig.4.3.2C). Contudo quando se determinou a razão GSH/GSSG (Fig.4.3.2D) observou-se um acréscimo significativo deste parâmetro em células apenas expostas ao vanádio, efeito que foi 90 vezes superior nas culturas crescidas na presença de vanádio e de qualquer um dos extratos de maçã analisado, pelo que a estabilização do ambiente redutor pelo par redox GSH/GSSG parece fortemente assegurado pela presença dos extratos frutais.



**Figura 4.3.2** Conteúdo em glutatióno (A), dissulfureto de glutatióno (B), tióis totais não proteicos (C) e razão GSH/GSSG (D) de células de *S. cerevisiae* BY4741, crescidas em meio YEPD na ausência e na presença de pentóxido de vanádio (2 mM), assim como na presença de pentóxido de vanádio (2 mM) e extrato de maçã (5 %). Os resultados representam a média de seis experiências independentes  $\pm$  desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,01$ ).

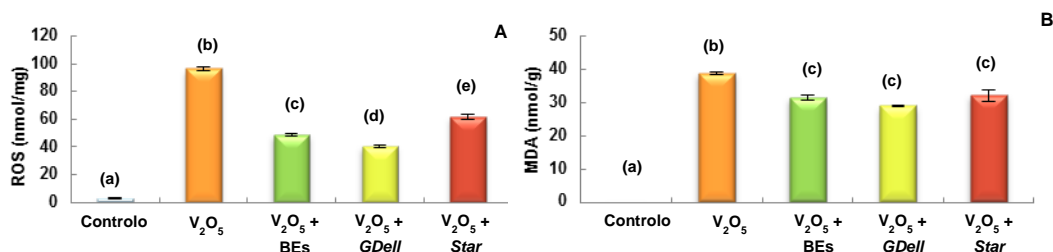
A figura 4.3.3A revela que apenas as células crescidas na presença de pentóxido de vanádio ou deste e extrato aquoso de maçã Bravo de Esmolfe ( $p < 0,05$ ) contribuíram para um aumento da atividade glutatióno redutase (GR), uma vez que na presença de extrato aquoso maçã *Golden Delicious* ou *Starking* não foram detetadas alterações significativas desta atividade catalítica, relativamente à cultura controlo, fato que sugere que o efeito do vanádio sobre a capacidade de regeneração do GSH foi significativamente revertida pelos extratos aquosos de maçã *Golden Delicious* e *Starking*. A figura 4.3.3B parece contribuir melhor para a interpretação das alterações da razão GSH/GSSG descritas na figura 4.3.2D uma vez que todas as células expostas ao vanádio exibiram um decréscimo significativo da atividade GPx que muito provavelmente contribuiu para manter baixo o conteúdo em dissulfureto de glutatióno, resposta que em termos percentuais foi superior nas culturas expostas ao vanádio (V) e a qualquer dos extratos aquosos de polpa de maçã. Esta resposta poderá explicar as alterações da razão GSH/GSSG mas levanta uma questão: como é que as células sobreviveram na fase inicial da exposição ao vanádio, um indutor de *stress* oxidativo, se a atividade GPx se encontrava diminuída pela presença do metal? Uma interpretação do fenómeno pode ser dada pelas figuras 4.3.3C e D que ilustram o efeito do pentóxido de vanádio e dos extratos de maçã sobre catalases citoplasmáticas e peroxissomais. Nessas figuras observa-se um decréscimo significativo das referidas atividades catalíticas em células crescidas apenas na presença de pentóxido de vanádio (2mM). Contudo, células expostas ao pentóxido de vanádio (2 mM) e qualquer dos extratos aquosos de maçã sofreram uma reposição com significado estatístico da atividade catalase

T para níveis iguais aos do controlo e da atividade catalase A para níveis superiores ao respetivo controlo.



**Figura 4.3.3** Atividade catalítica de enzimas antioxidantes GR (A), GPx (B), CAT T (C) e CAT A (D) de células de *S. cerevisiae* BY4741, crescidas em meio YEPD na ausência e na presença de pentóxido de vanádio (2 mM), assim como na presença de pentóxido de vanádio (2 mM) e extrato de maçã (5 %). Os resultados representam a média de seis experiências independentes ± desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,01$ ).

Assim, quando se observou a figura 4.3.4 detetou-se um aumento estatisticamente significativo do conteúdo em ROS, um marcador de *stress* oxidativo e dos níveis de MDA, um marcador de danos celulares por peroxidação lipídica, em células crescidas na presença de pentóxido de vanádio. Deste modo, consegue-se perceber que a deficiência em GPx e catalases poderão estar na origem do aumento de ROS, danos e perda de viabilidade celular. No entanto, a presença dos extratos aquosos de polpa de maçã parecem contribuir para reverter com significado estatístico esta resposta ao metal, fato que poderá assegurar no início da exposição um aumento do peso seco e da atividade fosfatase alcalina, resposta que parece insuficiente para garantir a viabilidade celular no final da cultura de *S.cerevisiae* BY4741.



**Figura 4.3.4** Conteúdo em ROS (A) e MDA (B) de células de *S. cerevisiae* BY4741, crescidas em meio YEPD na ausência e na presença de pentóxido de vanádio (2 mM), assim como na presença de pentóxido de vanádio (2 mM) e extrato de maçã (5 %). Os resultados representam a média de seis experiências independentes ± desvio-padrão. As barras assinaladas com letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,01$ ).



## 5. Conclusões

Em termos nutritivos os resultados descritos na seção 4.1 permitem concluir que a pele das três variedades de *Malus domestica* Borkh era mais rica do que a polpa em vitaminas do complexo B. Por outro lado, a variedade *Golden Delicious* conservou melhor o conteúdo em tiamina da polpa e pele ao longo do período de colheita, enquanto que a riboflavina foi melhor conservada na pele de maçãs *Starking*.

O conteúdo em glúcidos totais da polpa era da mesma ordem de grandeza nas três variedades em qualquer tempo de colheita enquanto que na pele era a Bravo de Esmolfe que possuía maior quantidade no primeiro tempo de colheita, ficando os valores idênticos em qualquer variedade no segundo tempo. Por outro lado, a quantidade de glúcidos redutores da polpa era igual em qualquer das variedades e em qualquer tempo de colheita enquanto na pele revelou-se superior na variedade Bravo de Esmolfe ao primeiro tempo de colheita, ocorrendo a relação inversa, ao segundo tempo, para as variedades *Golden Delicious* e *Starking*. Como a SDH da variedade Bravo de Esmolfe exibia níveis de atividade mais elevados no primeiro tempo de colheita, é provável que possuísse um sabor mais adocicado, assegurado por níveis mais elevados de frutose na primeira recolha de frutos.

O conjunto de resultados descritos na seção 4.2 permitiram detetar valores significativamente superiores do conteúdo em fenóis do extrato aquoso e etanólico na polpa e na pele de maçãs Bravo de Esmolfe, bem como da capacidade antioxidante estimada pelo DPPH, FRAP, níveis de ascorbato, GSH, GSSG, tióis não-proteicos, da razão GSH/GSSG e de prolina que permitem prever que a colheita precoce desta variedade poderá contribuir para preservar o valor funcional deste fruto, bem como incrementar a qualidade da sua preservação. Contudo, em todos os casos estas propriedades sofreram um decréscimo significativo ao longo do tempo de colheita, parecendo a resposta antioxidante mediada por sistemas não enzimáticos, ser parcialmente substituída pelas atividades enzimáticas antioxidantes PDH, POD, GPx, SOD e G6PD que prevaleceram idênticas ou superiores às das outras variedades. Deste modo, a colheita tardia poderá ter diminuído o valor funcional em termos de capacidade antioxidante dos frutos da variedade Bravo de Esmolfe, embora em termos de conservação os frutos desta cultivar possam ainda ser melhor preservados do que os das outras duas variedades, *Golden Delicious* e *Starking*, graças à contribuição antioxidante por sistemas enzimáticos.

O estudo de atividade biológica realizado com extratos aquosos do primeiro tempo de colheita de *M. domestica*, descrito na seção 4.3 deste relatório, procurou avaliar a influência de extratos de maçã no meio de cultura sobre o efeito indutor de stress oxidativo descrito para o V (V). Assim pode-se concluir que a presença de vanádio induziu um aumento significativo da biomassa celular expressa pelo peso seco e pela atividade fosfatase alcalina

na fase inicial do crescimento, provavelmente associada a alterações do *turnover* lipídico moduladas por reações de desfosforilação em que terá estado envolvida a fosfatase alcalina. Contudo, na fase final do crescimento detetou-se um decréscimo significativo da viabilidade celular em culturas onde estava presente o pentóxido de vanádio (2mM) que foi parcial e significativamente revertida pela exposição conjunta dos extratos aquosos de cada variedade de *Malus domestica* testada. Observou-se ainda que células expostas ao pentóxido de vanádio (2mM) e ao extrato aquoso de qualquer das variedades de maçã exibiam perturbações na homeostase do glutatióno que contribuiram para um decréscimo da viabilidade celular em tióis não proteicos, fato que provavelmente comprometeu a capacidade tampão do tripéptido em *S. cerevisiae* BY4741, apesar da razão GSH/GSSG aumentar significativamente na presença do pentóxido de vanádio e/ou extratos aquosos de maçã. Deste modo, o aumento estatisticamente significativo do ROS e dos níveis de MDA, um marcador de danos celulares por peroxidação lipídica, detetado em células crescidas na presença de pentóxido de vanádio, parece ser coerente com a perda de estabilidade redox no interior celular. O decréscimo das atividades GPx e catalases observado em *S. cerevisiae* BY4741 expostas ao pentóxido de vanádio poderá justificar as alterações de ROS e MDA, bem como a perda de viabilidade celular no final da cultura e referida nos comentários à figura 4.3.1. Como a presença dos extratos aquosos de polpa de maçã reverteram parcialmente e com significado estatístico, esta resposta ao metal, admite-se que a reversão parcial da perda de viabilidade celular detetada no final da cultura, pelos extratos aquosos de *M. domestica* poderá estar, em parte, correlacionada com o aumento das atividades CAT T e CAT A que suportaram a desintoxicação do peróxido de hidrogénio bloqueada pela perda de atividade GPx.

Face ao exposto, pode-se admitir que o extrato aquoso de qualquer das maçãs exibiu um comportamento antioxidante, contribuindo para maximizar a razão GSH/GSSG e diminuir o ROS e MDA, resposta que não pode ser justificada em exclusivo pelas alterações das atividades CAT T e CAT A, mas que foram também provavelmente influenciadas pela capacidade antioxidante desempenhada pelos fenóis, ascorbato e glutatióno, abundantes no extrato aquoso do primeiro tempo de colheita da variedade Bravo de Esmolfe. Estes resultados permitem assim valorizar a importância do tempo de colheita na preservação dos constituintes envolvidos em processos de desintoxicação celular.



## 6. Referências bibliográficas

- Alam Md N, Bristi NJ, Rafiquzzaman Md (2013) Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity, *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21, 143-152
- Alberto MR, Canavosio, MAR, Nadra MCM (2006) Antimicrobial effect of polyphenols from apple skins on human bacterial pathogens, *Electronic Journal of Biotechnology*, 9, 3
- Arrigoni O, Tullio M (2002) Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochim Biophys Acta* 1569, 1-9
- Assem FL, Levy LS (2009) A Review of Current Toxicological Concerns on Vanadium Pentoxide and Other Vanadium Compounds: Gaps in Knowledge and Directions for Future Research, *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B: Critical Reviews*, 12, 289-306
- Awad MA, de Jager A, van der Plas LHW, van der Krol AR (2001) Flavonoid and chlorogenic acid changes in skin of “Elstar” and “Jonagold” apples during development and ripening, *Scientia Horticulturae*, 90, 69-83
- Banhegyi G, Braun L, Csala M, Puskás F, Mandl J (1997) Ascorbate metabolism and its regulation in animals, *Free Radical Biology and Medicine*, 23, 793–803.
- Barracosa, P; Almeida, S; Lopes, A. (2008) Análise da diversidade genética com marcadores RAPD em variedades regionais de macieira (*Malus domestica* Borkh.) In: Variedades Regionais e Agricultura Biológica. Desafios para peras e maçãs portuguesas. Simões O, Lopes A e Ferreira J Ed. Capítulo 1 - Variedades regionais portuguesas, 38-42, Coimbra.
- Bates L S, Waldren R P, Teare I D (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies, *Plant and soil*, 39, 205-207.
- Bayliak MM, Lushchak VI (2011) The golden root, *Rhodiola rosea*, prolongs lifespan but decreases oxidative stress resistance in yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Phytomedicine*, 18, 1262-1268
- Beers RJR, Sizer I (1952) A Spectrophotometric Method For Measuring The Breakdown Of Hydrogen Peroxide By Catalase, *Journal of Biological Chemistry*, 195, 133-140.
- Benzie IFF, Strain JJ (1996) The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay, *Analytical Biochemistry*, 239, 70–76
- Benzie IFF, Strain JJ (1999) - Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration; *Methods in Enzymology*, 299, 15–27.
- Bera AK, Rana T, Debasis B, Das S, Pan D, Das KS (2011) Sodium Arsenite-Induced Alteration in Hepatocyte Function of Rat with Special Emphasis on Superoxide Dismutase Expression Pathway and its Prevention by Mushroom Lectin, *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 109, 240-244.
- Bergmeyer H, Grabl M (1983) Method of Enzymatic Analysis, Volume II, Samples, Reagents, assessment of Results, 3rd ed., *Verlag Chemie*, Florida.
- Bittman R. (1974) Analysis of reducing sugars in breakfast cereal and other foods, *Journal of Chemical Education*, 51, 46-47.
- Blois MS (1958) Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical, *Nature*, 181, 1199 – 1200.

- Bonatto D (2007) A systems biology analysis of protein–protein interactions between yeast superoxide dismutases and DNA repair pathways. *Free Radical Biology & Medicine*, 1,43, 557–567.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995) Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Academic Press*, 28, 25-30.
- Cai W M, Tang Z C (1999) Plant tolerance physiology. In: Tang ZC (ed) *Experimental guide for modern plant physiology*, 1st edn. Science Press, *Beijing*, 315–316.
- Calu M, Bonciu C, Tofan I (2009) Physico-Chemical characteristics of apples stored in chilling and controlled atmosphere conditions, *Food Technology*, 34, 32-37
- Cano M P, Hernández A (1998) High-Pressure and Temperature Effects on Enzyme Inactivation in Tomato Puree, *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 46, 266-270.
- Carbone K, Giannini B, Picchi V, Scalzo LR, Cecchini F (2011) Phenolic composition and free radical scavenging activity of different apple varieties in relation to the cultivar, tissue type and storage, *Food Chemistry*, 127, 493-500
- Carocho M, Ferreira ICFR (2013) A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives, *Food and Chemical Toxicology*, 51, 15-25.
- Cecchini NM, Monteoliva MI, Alvarez ME (2011) Proline Dehydrogenase Contributes to Pathogen Defense in Arabidopsis, *Plant Physiology*, 155, 1947–1959.
- Ceyman M, Arrigoni E, Scharer H, Nisimg BA, Hurrell RF (2012) Identification of apples rich in health-promoting flavan-3-ols and phenolic acids by measuring the polyphenol profile, *Journal of Food Composition and Analysis*, 26, 128-135
- Cipak A, Jaganjac M, Tehlivets O, Kohlwein SD, Zarkovic N (2007) Adaptation to oxidative stress induced by polyunsaturated fatty acids in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1781, 283–287.
- Costigan M, Cary R, Dobson S (2001) Vanadium pentoxide and other inorganic vanadium compounds in: *Concise International Chemical Assessment Document 29*, WHO, Geneva
- Costilow RN, Cooper D (1978) Identity of proline dehydrogenase and delta1-pyrroline-5-carboxylic acid reductase in *Clostridium sporogenes*, *Journal of Bacteriology*, 134, 139-146.
- Dinis I (2007) A Certificação de Variedades Tradicionais de Maçã. O Caso Particular da DO Bravo de Esmolfe in: *Seminários CERNAS –Biodiversidade e Denominações de Origem. Uma Problemática Global*, Centro de Estudos de Recursos Naturais, Economia e Sociedade (CERNAS) e Escola Superior Agrária de Coimbra (ESAC), Portugal, 10pp.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances, *Analytical Chemistry*, 28, 350-356.
- Eguchi M (1995) Alkaline phosphatase isozymes in insects and comparison with mammalian enzyme. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 11B, 151-162.
- Endo T, Fukunaga T, Yoshimura T, Esumi K, (2006) Scavenging DPPH radicals catalyzed by binary noble metal–dendrimer nanocomposites, *Journal Colloid Interface Science*, 302, 516–521.
- Flohé L, Gunzler W (1984) Assay of glutathione peroxidase, *Methods in Enzymology*, 105, 114-121.
- Francoa R, Sánchez-Oleab R, Reyes-Reyesc EM, Panayiotidis MI (2009) Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: *Ménage à Trois*, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 674, 3–22.

- Gomez M, Lajolo F (2008) Ascorbic acid metabolism in fruits: activity of enzymes involved in synthesis and degradation during ripening in mango and guava, *Journal of Science Food and Agriculture*, 88, 756-762.
- González-Villalva A, Piñon Zárata G, De la Peña DA, Flores-Garcia M, Bizarro-Nevarés P, Rendón-Huerta EP, Colín-Barenque L, Fortoul TI (2011) The effect of vanadium on platelet function, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 32, 447-456
- Hamada MA, Jonsson LMV (2013) Thiamine treatments alleviate aphid infestations in barley and pea, *Phytochemistry*, article in press.
- Hissin A, Hilf PJ (1976) A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Analytical Biochemistry*, 74, 214–226.
- Horiguchi H, Yurimoto H, Goh T, Nakagawa T, Kato N, Sakai Y (2001) Peroxisomal Catalase in the Methylophilic Yeast *Candida boidinii*: Transport Efficiency and Metabolic Significance. *Journal of Bacteriology*, 183: 6372–6383.
- Iacopini P, Camangi F, Stefani A, Sebastiani L (2010) Antiradical potential of ancient Italian apple varieties of *Malus domestica* Borkh. in a peroxynitrite-induced oxidative process, *Journal of Food Composition and Analysis*, 23, 518–524.
- Imeh U, Khokhar S (2002) Distribution of Conjugated and Free Phenols in Fruits: Antioxidant Activity and Cultivar Variations, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6301-6306
- Jomova K, Vondrakova D, Lawson M, Valko M (2010) Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders, *Mol Cell Biochem*, 345, 91-104.
- Kang F, Rawsthorne S (1996) Metabolism of glucose-6-phosphate and utilization of multiple metabolites for fatty acid synthesis by plastids from developing oilseed rape embryos, *Planta*, 199, 321-327
- Karuppanapandian T, Moon J-C, Kim C, Manoharan K, Kim W (2011) Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms, *Australian Journal of Crop Science*, 5, 709 – 725.
- Koksharov M, Lv C, Zhai X, Ugarova N, Huang E. (2013) *Bacillus subtilis* alkaline phosphatase IV acquires activity only late at the stationary phase when produced in *Escherichia coli*. Overexpression and characterization of the recombinant enzyme, *Protein Expression and Purification*, 90, 186–194.
- Lata B, Trampczynska A, Olés, M (2005) Antioxidant content in the fruit peel, flesh and seeds of selected apple cultivars during cold storage, *Horticulturae*, 47-60
- Lata B. (2008) Apple peel antioxidant status in relation to genotype, storage type and time, *Scientia Horticulturae*, 117, 45–52.
- LeBel PC, Ischiropoulos H, Bondys CS (1990) Evaluation of the Probe 2, 7-Dichlorofluorescein as an Indicator of Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress, *Chemical Research in Toxicology*, 5, 227-231.
- Lehman S, Funck D, Szabados L, Rentsch, D (2010) Proline metabolism and transport in plant development, *Amino Acid*, 39, 949-962.
- Lemos N, Fernandes F, Costa D e Correia, H (2009) Estudo comparativo de diferentes grupos de variedades de macieiras, *Revista Millenium*, 37, 10pp (<http://www.ipv.pt/millenium/Millenium37/default.htm>)
- Li M, Feng F, Cheng L (2012) Expression Patterns of Genes Involved in Sugar Metabolism and Accumulation during Apple Fruit Development, *PLoS ONE*, 7, 1-14
- Li M-J, Ma F-W, Zhang M, Pu F (2008) Distribution and metabolism of ascorbic acid in apple fruits (*Malus domestica* Borkh cv. Gala), *Plant Science*, 174, 606–612

- Liu Q, Parsons AJ, Xue H, Jones CS, Rasmussen S (2013) Functional characterisation and transcript analysis of alkaline phosphatase from the arbuscular mycorrhizal fungus *Funneliformis mosseae*, *Fungal Genetics and Biology*, 54, 52–59.
- López-Alarcón C, Denicola A (2013) Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays, *Analytica Chimica Acta*, 763, 1–10
- Lowry OH, Rosenbrough NJ e Farr AL (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent, *Journal Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Matamoros MA, Loscos J, Dietz K-J, Aparicio-Tejo PM, Becana M (2010) Function of antioxidant enzymes and metabolites during maturation of pea fruits, *Journal of Experimental Botany*, 61, 87-97.
- Matés J (2000) Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*, 153: 83-104.
- Moskalyk RR, Alfantazi AM (2003) Processing of vanadium: a review, *Minerals Engineering*, 16, 793-805
- Oberley LW, Spitz DR (1984) Assay of SOD activity in tumor tissue. *Methods Enzymol.* 105, 457–464.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Analytical Biochemistry*, 95, 351–358.
- Onishi H, Tkacz J, Lampen J (1979) Glycoprotein Nature of Yeast Alkaline Phosphatase – Formation of active enzyme in the presence of tunicamycin. *The Journal of Biological Chemistry*, 254: 11943-11952.
- Ozer N, Aksoy Y, Ogus IH (2001) Kinetic properties of human placental glucose-6-phosphate dehydrogenase, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 33, 221-226
- Petteys B, Frank EL (2011) Rapid determination of vitamin B2 (riboflavin) in plasma by HPLC, *Clinica Chimica Acta*, 412, 38-43.
- Plaza L, de Ancos B, Cano MP (2003) Nutritional and health-related compounds in sprouts and seeds of soybean (*Glycine max*), wheat (*Triticum aestivum*.L) and alfalfa (*Medicago sativa*) treated by a new drying method, *European Food Research and Technology*, 16, 138-144
- Prior RL, Wu X, Schaich K, (2005) Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements, *Journal Agric Food Chem*, 53, 4290-4302
- Ratnam DV, Ankola DD, Bhardwaj V, Sahana DK, Kumar MNVR (2006) Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective, *Journal of Controlled Release*, 113, 189-207
- Reuter S, Gupta S, Chaturverdi M, Aggarwal B (2010) Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked?, *Free Radical Biology Medicine*, 49, 1603–1616
- Schuler D, Chevalier H-J, Merker M, Morgenthal K, Ravanat J-L, Sagelsdorff P, Walter M, Weber K, McGregor D (2011) First Steps Towards an Understanding of a Mode of Carcinogenic Action for Vanadium Pentoxide, *Journal of Toxicological Pathology*, 24, 149-162
- Singh S, Anand A, Srivastava PK (2012) Regulation and properties of glucose-6-phosphate dehydrogenase: A review, *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry*, 4, 1-19
- Singleton VL., Rossi, JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.

- Sivaci A (2006) Seasonal changes of total carbohydrate contents in three varieties of apple (*Malus sylvestris* Miller) stem cuttings, *Scientia Horticulturae*, 109, 234-237.
- Slatnar A, Petkovsek, M. Halbwirth H, Stampar F, Stich K, Veberic R (2012) Polyphenol metabolism of developing apple skin of a scab resistant and a susceptible apple cultivar, *Trees*, 26, 109-119
- Soares de Arruda VA, Pereira AAS, de Freitas AS, Barth OM, de Almeida-Muradian LB (2013) Dried bee pollen: B complex vitamins, physicochemical and botanical composition, *Journal of Food Composition and Analysis*, 29, 100-105.
- Soobrattee MA, Neergheen VS, Luximon-Ramma A, Aruoma OI, Bahorun T (2005) Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions, *Mut Res*, 579, 200–213.
- Souvannavong V, Lemaire C, Nay D, Brown S, Adam A (1995) Expression of alkaline phosphatase by a B-cell hybridoma and its modulation during cell growth and apoptosis, *Immunology Letters*, 47, 163–170.
- Stein H, Honiga A, Millera G, Erstera O, Eilenberga H, Csonkab LN, Szabadosc L, Konczc C, Zilberstein A (2011) Elevation of free proline and proline-rich protein levels by simultaneous manipulations of proline biosynthesis and degradation in plants, *Plant Science*, 181, 140-150.
- Stracke BA, Rufer CE, Weibel FP, Bub A, Watzl B (2009) Three-Year Comparison of the Polyphenol Contents and Antioxidant Capacities in Organically and Conventionally Produced Apples (*Malus domestica* Bork. Cultivar 'Golden Delicious'), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 4598-4605
- Takemura Y, Satoh M, Satoh K, Hamada H, Sekido H, Kubota S. (2010) High dose of ascorbic acid induces cell death in mesothelioma cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 394, 249–253.
- Tausz M, Sircelj H, Grill D (2004) The glutathione system as a stress marker in plant ecophysiology: is a stress-response concept valid?, *Journal of Experimental Botany*, 55, 1955-1962
- Tenore CG, Campiglia P, Stiuso P, Ritieni A, Novellino E (2013) Nutraceutical potential of polyphenolic fractions from Annurca apple (*M. pumila* Miller cv Annurca), *Food Chemistry*, 140, 614-622
- Teo G, Suzuki Y, Uratsu S L, Lampinen B, Ormonde N, Hu WK, DeJong TM, Dandekar AM (2006) Silencing leaf sorbitol synthesis alters long-distance partitioning and apple fruit quality, *PNAS*, 103, 18842-18847
- Tsao R, Yang R, Xie, S, Sockovie, E, Khanizadeh S (2005) Which Polyphenolic Compounds Contribute to the Total Antioxidant Activities of Apple?, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 4989-4995.
- Valle L (2011) Oxidative stress in aging: Theoretical outcomes and clinical evidences in humans, *Biomedical Aging Pathology*, 1, 1–7.
- Verslues PE, Shama S (2010) Proline Metabolism and Its Implications for Plant-Environment Interaction, *American Society of Plant Biologists, The Arabidopsis Book*.
- Vilaça R, Mendes V, Mendes MV, Carreto L, Amorim MA, Freitas V, Moradas-Ferreira P, Mateus N, Costa V (2012) Quercetin Protects *Saccharomyces cerevisiae* against Oxidative Stress by Inducing Trehalose Biosynthesis and the Cell Wall Integrity Pathway, *Plos one*, 7(9): e45494. doi:10.1371/journal.pone.0045494
- Wolfe KL, Liu HR (2003) Apple Peels as a Value-Added Food Ingredient, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1676-1683

- Yamaki S, Ishikawa K (1986) Roles of four sorbitol-related enzymes and invertase in the seasonal alteration of sugar metabolism in apple tissue, *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 111,134–137.
- Yoshihara D, Fujiwara N, Suzuki K (2010) Antioxidants: Benefits and risks for long-term health. *Maturitas*, 67, 103-107.
- Yu D, Walters DM, Zhu L, Lee P-K, Chen Y (2011) Vanadium pentoxide (V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) induced mucin production by airway epithelium, *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 301, L31-L39
- Zakrajšek T, Raspor P, Jamnik P. (2011) *Saccharomyces cerevisiae* in the stationary phase as a model organism — characterization at cellular and proteome level, *Journal of Proteomics*, 74, 2837-2845
- Zhang Y, Li P, Cheng L. (2010) Developmental changes of carbohydrates, organic acids, amino acids, and phenolic compounds in ‘Honeycrisp’ apple flesh, *Food Chemistry*, 123, 1013-1018

**Sites consultados:**

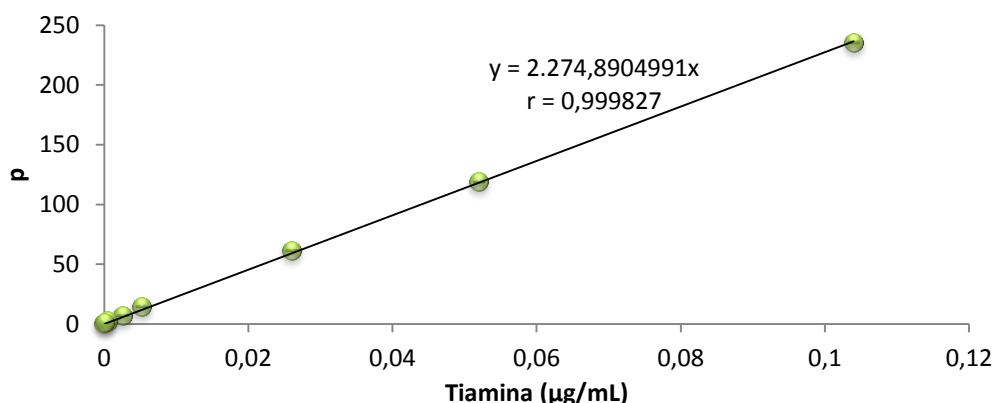
Ministério da Agricultura:

- a) [http://ptqc.drapc.min-agricultura.pt/documentos/maca\\_bravo\\_esmolfe.htm](http://ptqc.drapc.min-agricultura.pt/documentos/maca_bravo_esmolfe.htm)
- b) [http://ptqc.drapc.min-agricultura.pt/documentos/maca\\_beira\\_alta.htm](http://ptqc.drapc.min-agricultura.pt/documentos/maca_beira_alta.htm)

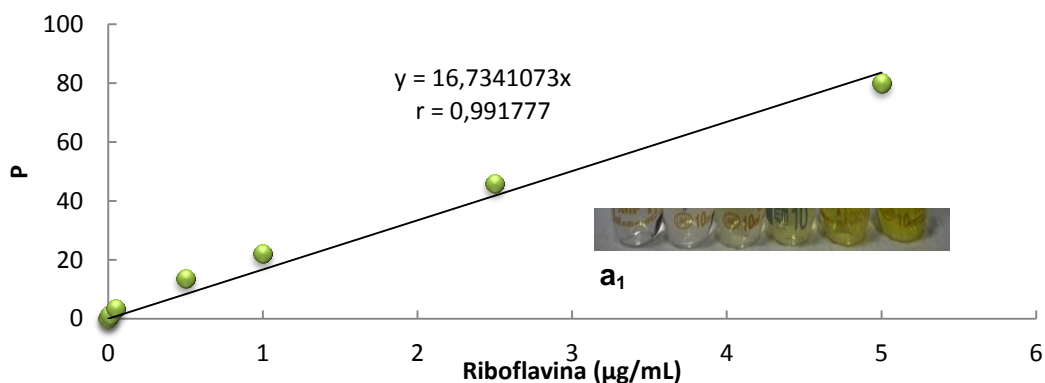
## **ANEXOS**



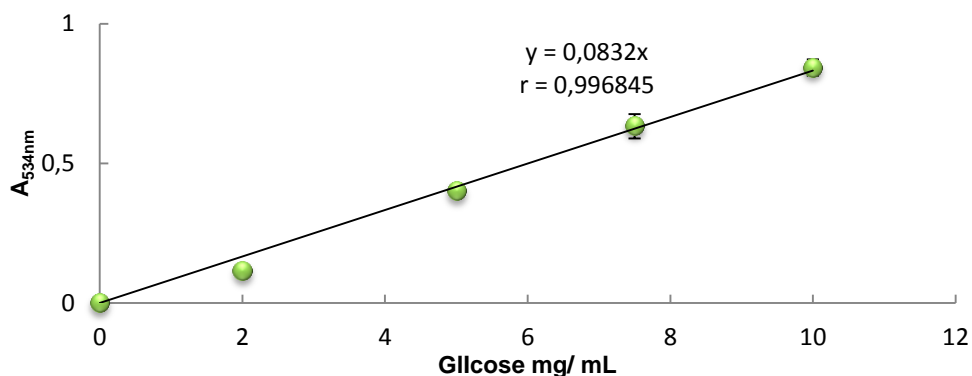




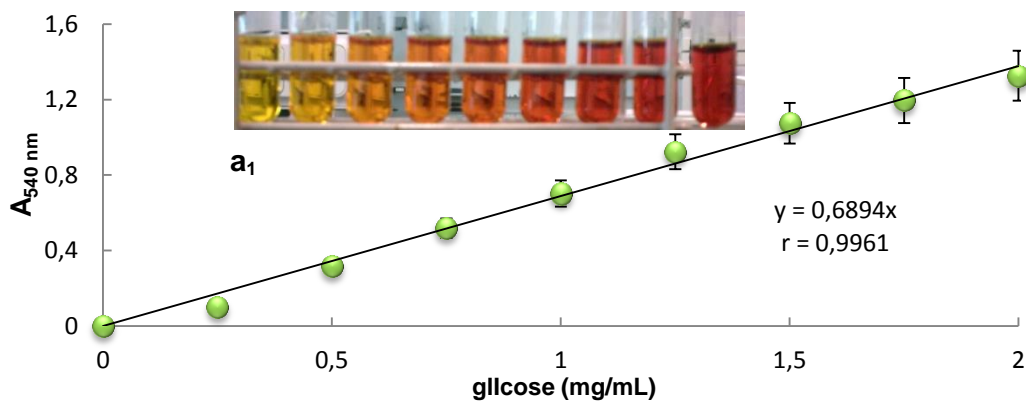
**Figura A1** – Representação gráfica da curva de calibração para a quantificação de tiamina, construída a partir da leitura da potência de fluorescência de soluções padrão (0-0,104 µg/mL). Os pontos representam a média aritmética de três experiências independentes ± desvio padrão.



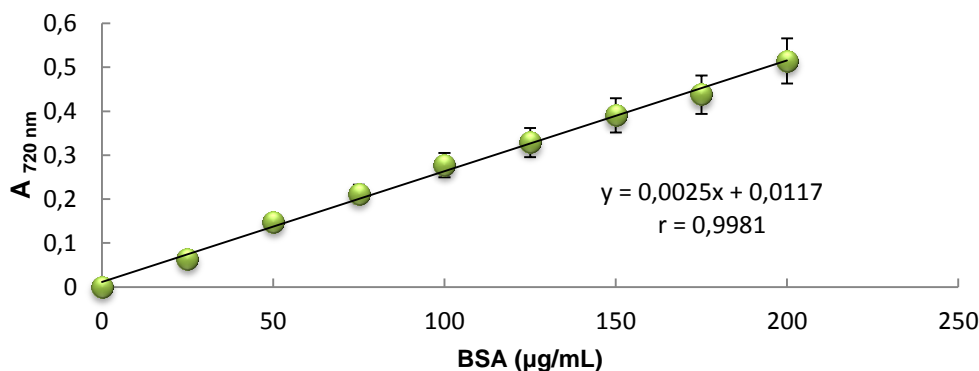
**Figura A2** – Representação gráfica da curva de calibração para a quantificação de riboflavina, construída a partir da leitura da potência de fluorescência de soluções padrão (0-5 µg/mL). Os pontos representam a média aritmética de três experiências independentes ± desvio padrão. a1 - Imagem fotográfica do “piano” de cores observado.



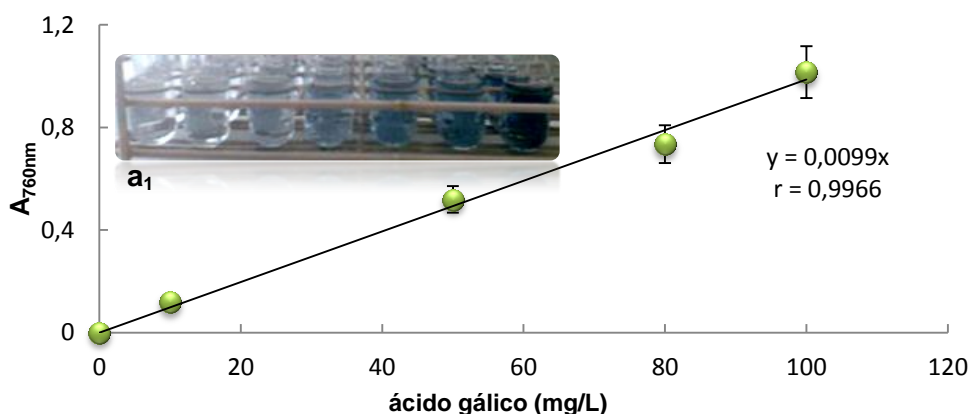
**Figura A3** – Representação gráfica da curva de calibração na quantificação de glicídios totais, construída a partir da leitura da absorvância de soluções padrão de glicose (0-10 mg/mL). Os pontos representam a média aritmética de três experiências independentes ± desvio padrão



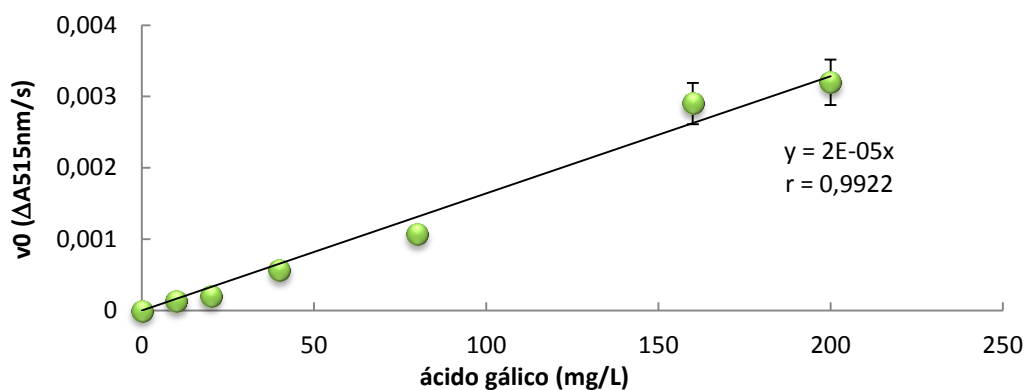
**Figura A4** – Representação gráfica da curva de calibração na quantificação de glicídidos redutores, construída a partir da leitura da absorvência de soluções padrão de glicose (0-2 mg/mL). Os pontos representam a média aritmética de cinco experiências independentes  $\pm$  desvio padrão. **a<sub>1</sub>** - Imagem fotográfica do “plano” de cores observado.



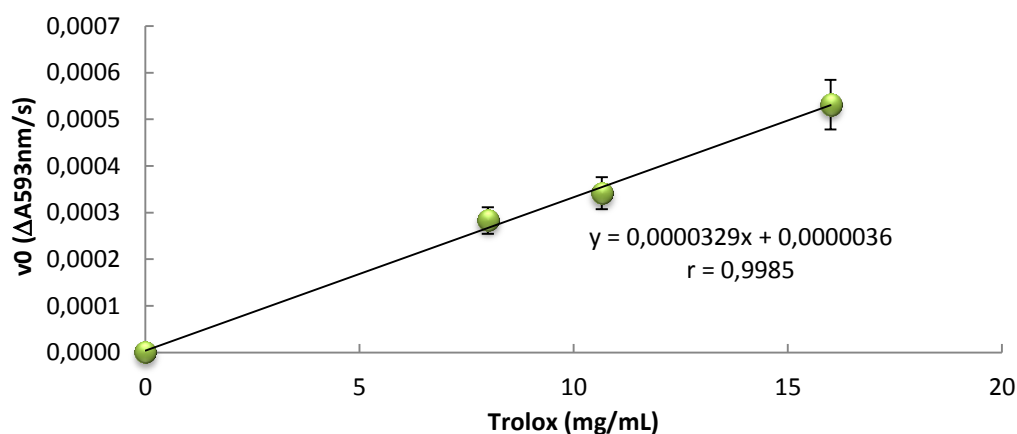
**Figura A5** - Representação gráfica da curva de calibração utilizada na quantificação de proteína, construída a partir da leitura de absorvência de soluções padrão de BSA (0-200 µg/mL). Os pontos representam a média aritmética de cinco experiências independentes  $\pm$  desvio padrão.



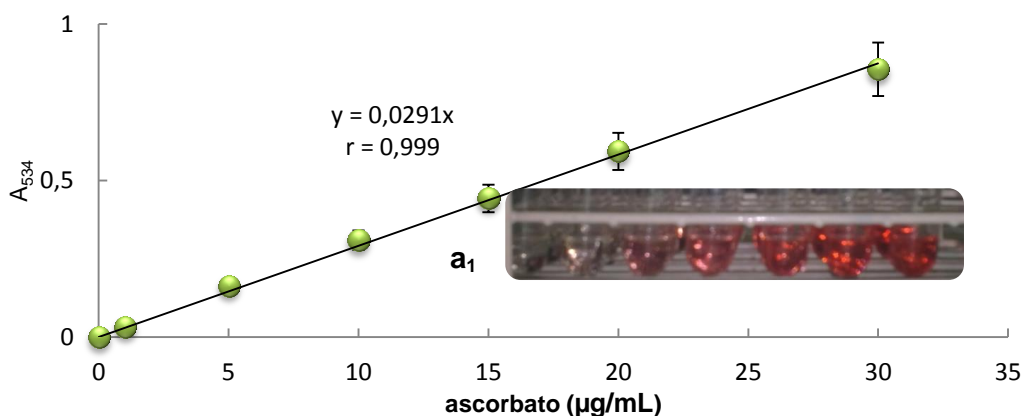
**Figura A6** - Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de polifenóis, construída a partir da leitura de absorvência de soluções padrão de ácido gálico (0-100 mg/L). Os pontos representam a média aritmética de cinco experiências independentes  $\pm$  desvio padrão. **a<sub>1</sub>** - Imagem fotográfica do “plano” de cores observado.



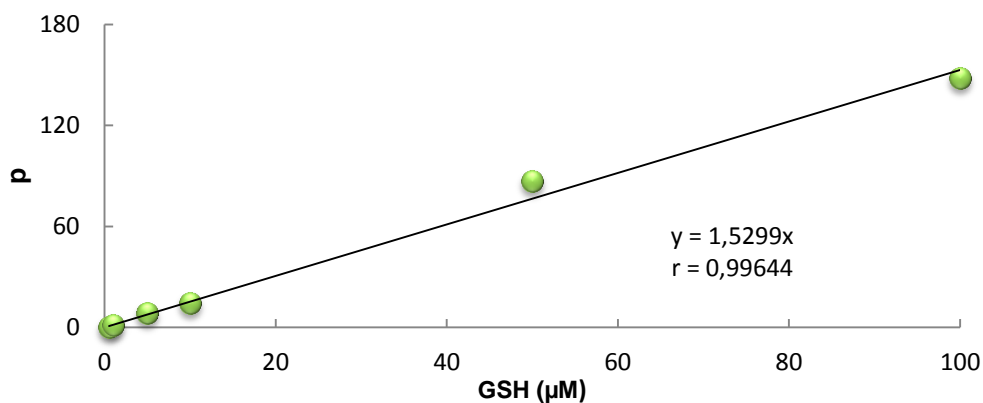
**Figura A7** – Representação gráfica da curva de calibração para a quantificação da capacidade antioxidante pelo método do DPPH construída a partir da leitura de absorvência de soluções padrão de ácido gálico (0-200 mg/L). Os pontos representam a média aritmética de cinco experiências independentes ± desvio padrão.



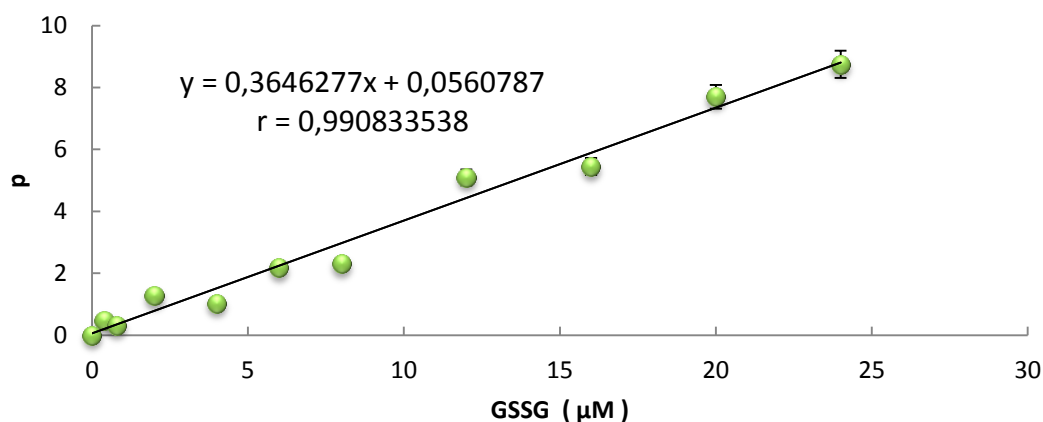
**Figura A8** – Representação gráfica da curva de calibração para a quantificação da capacidade antioxidante pelo método do FRAP construída a partir da leitura de absorvência de soluções padrão de trolox (0-16mg/mL). Os pontos representam a média aritmética de cinco experiências independentes ± desvio padrão.



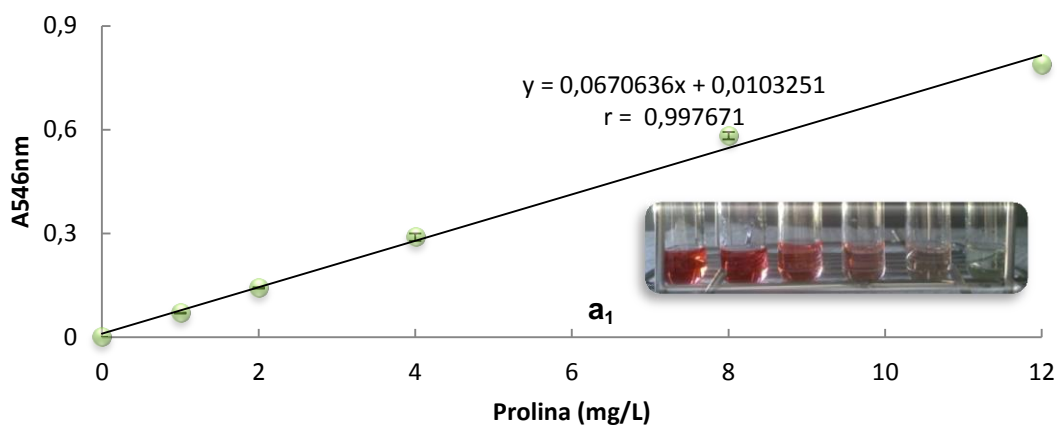
**Figura A9** – Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de ascorbato, construída a partir da leitura de absorvência de soluções padrão de ascorbato (0-30 mg/L). Os pontos representam a média aritmética de cinco experiências independentes ± desvio padrão. **a<sub>1</sub>** - Imagem fotográfica do “piano” de cores observado



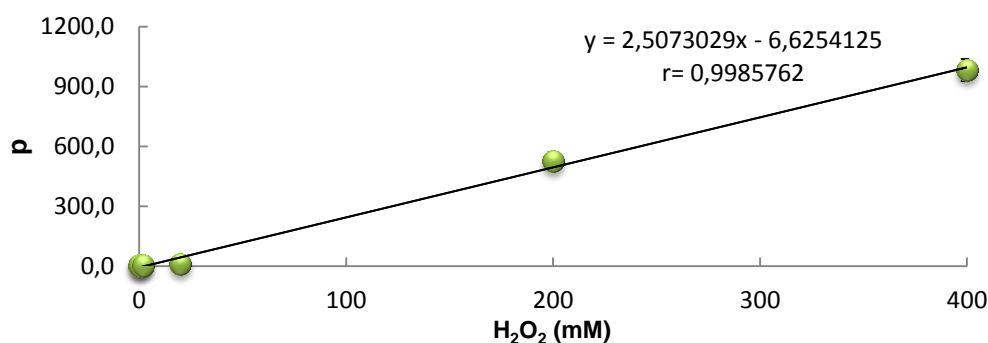
**Figura A10** – Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de GSH, construída a partir da leitura fluorimétrica de soluções padrão de GSH (0-100  $\mu\text{M}$ ). Os pontos representam a média aritmética de cinco experiências independentes  $\pm$  desvio padrão.



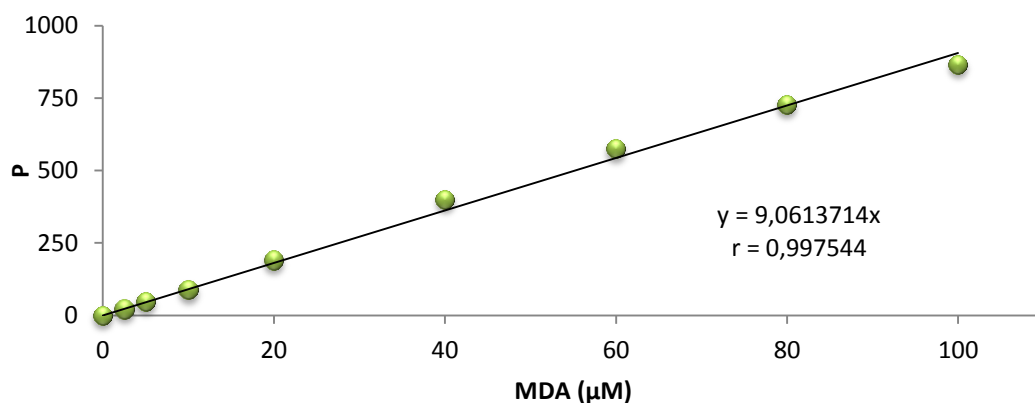
**Figura A11** – Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de GSSG, construída a partir da leitura fluorimétrica de soluções padrão de GSSG (0-24 $\mu\text{M}$ ). Os pontos representam a média aritmética de cinco experiências independentes  $\pm$  desvio padrão.



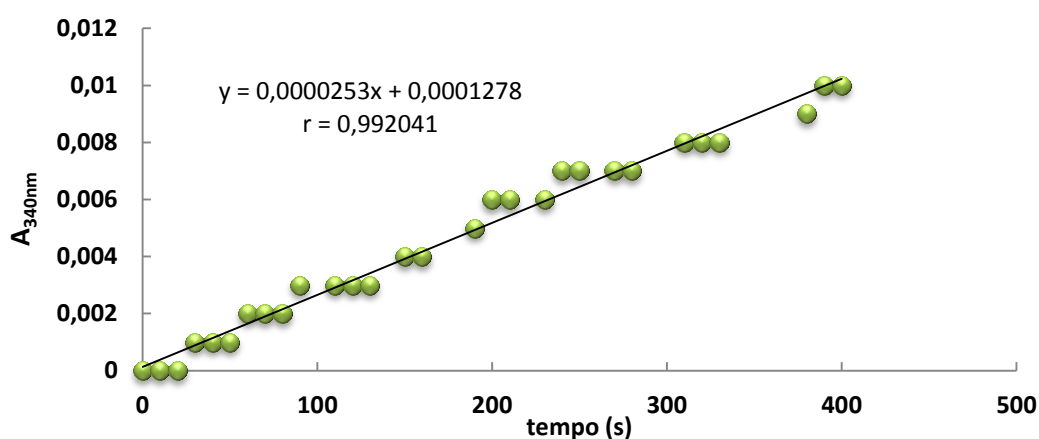
**Figura A12** – Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de prolina, construída a partir da leitura de absorvência de soluções padrão de ascorbato (0-12  $\text{mg/L}$ ). Os pontos representam a média aritmética de três experiências independentes  $\pm$  desvio padrão.  $a_1$  - Imagem fotográfica do "piano" de cores observado.



**Figura A13** – Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de ROS (0-400 mM), construída a partir da leitura fluorimétrica de soluções padrão de peróxido de hidrogénio. Os pontos representam a média aritmética de cinco experiências independentes  $\pm$  desvio padrão.



**Figura A14** – Representação gráfica da curva de calibração para quantificação de MDA (0-100 µM), construída a partir da leitura fluorimétrica de soluções padrão de MDA. Os pontos representam a média aritmética de cinco experiências independentes  $\pm$  desvio padrão.



**Figura A15** – Representação gráfica da curva de reação do enzima sorbitol desidrogenase de maçã *Starking* no primeiro tempo de colheita.

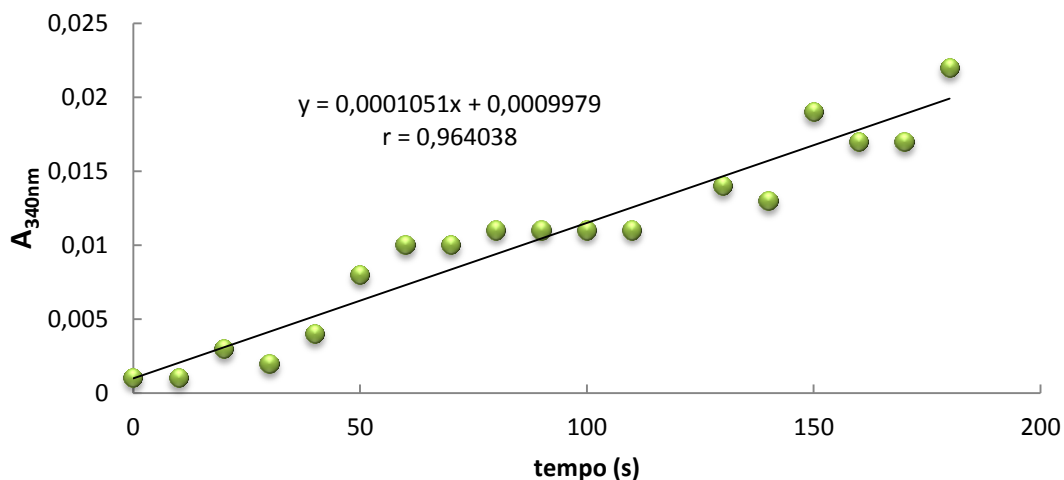


Figura A16 – Representação gráfica da curva de reação do enzima sorbitol desidrogenase de maçã Bravo de Esmolfe no primeiro tempo de colheita.

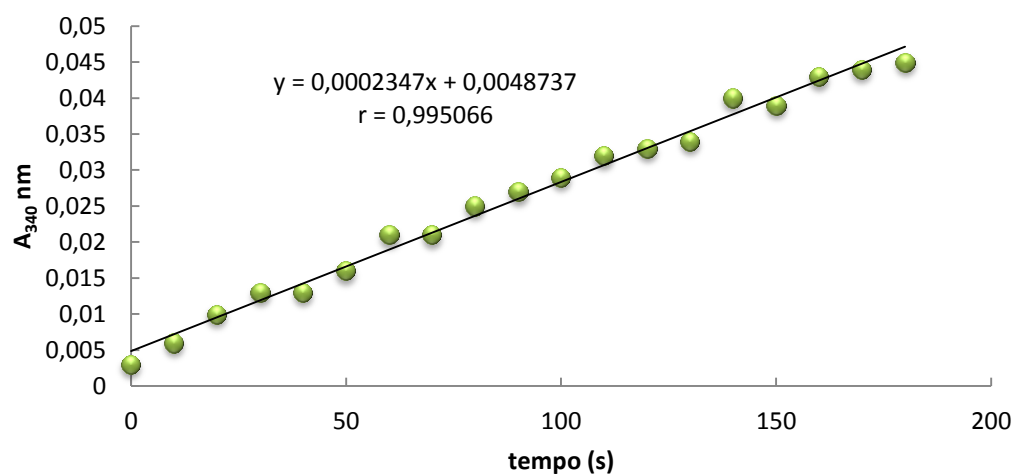


Figura A17 – Representação gráfica da curva de reação do enzima prolina desidrogenase de maçã Golden Delicious no segundo tempo de colheita.

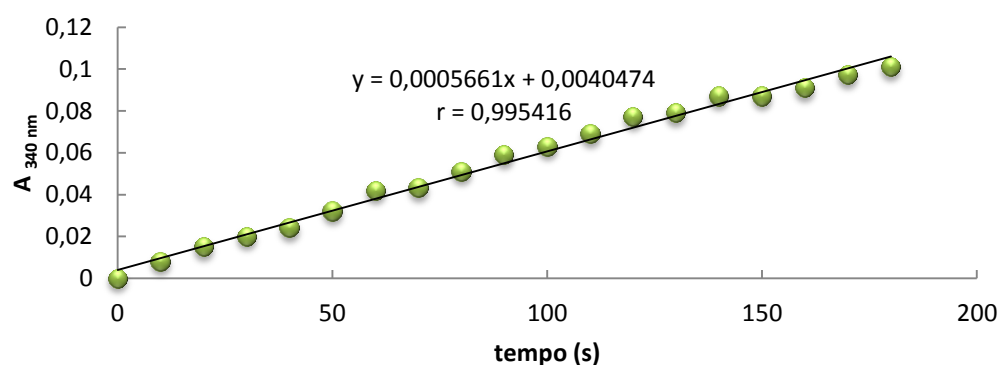
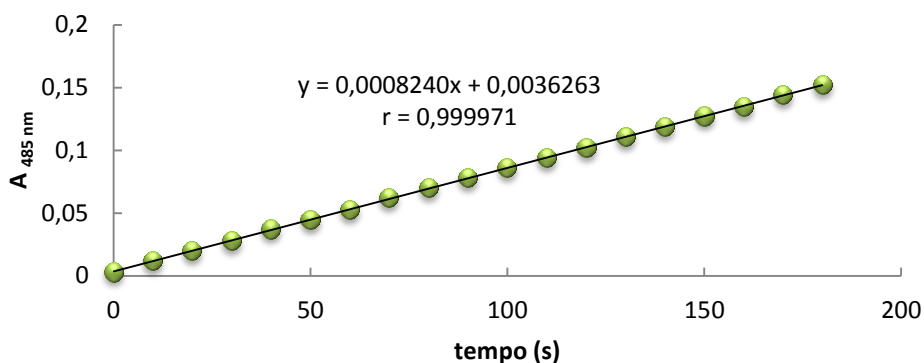
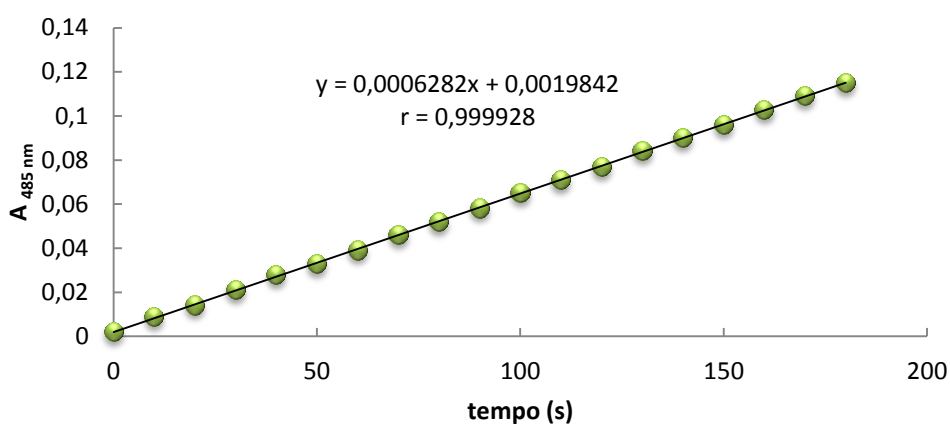


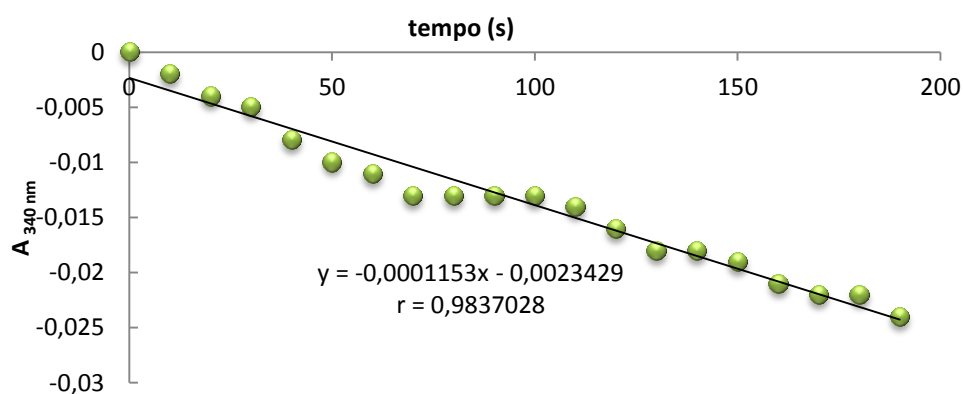
Figura A18 – Representação gráfica da curva de reação do enzima prolina desidrogenase de maçã Bravo de Esmolfe no primeiro tempo de colheita.



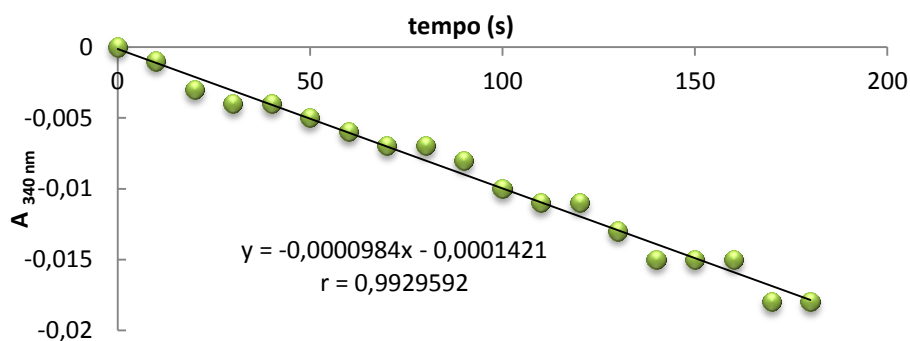
**Figura A19** – Representação gráfica da curva de reação do enzima peroxidase de maçã *Starking* no primeiro tempo de colheita.



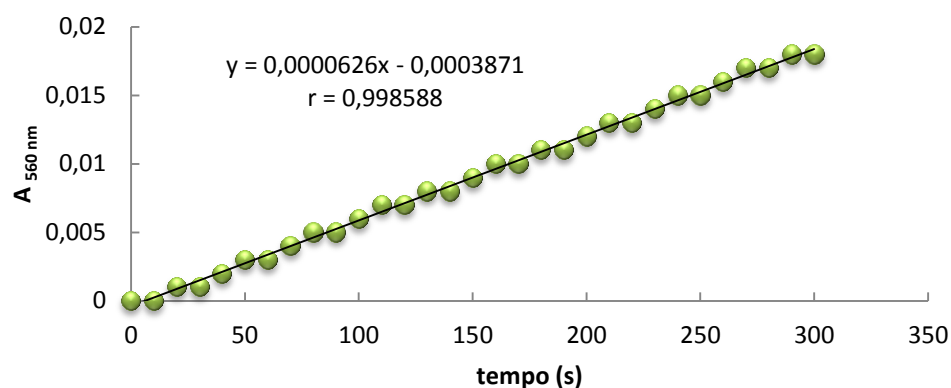
**Figura A20** – Representação gráfica da curva de reação do enzima peroxidase de maçã Bravo de Esmolfe no primeiro tempo de colheita.



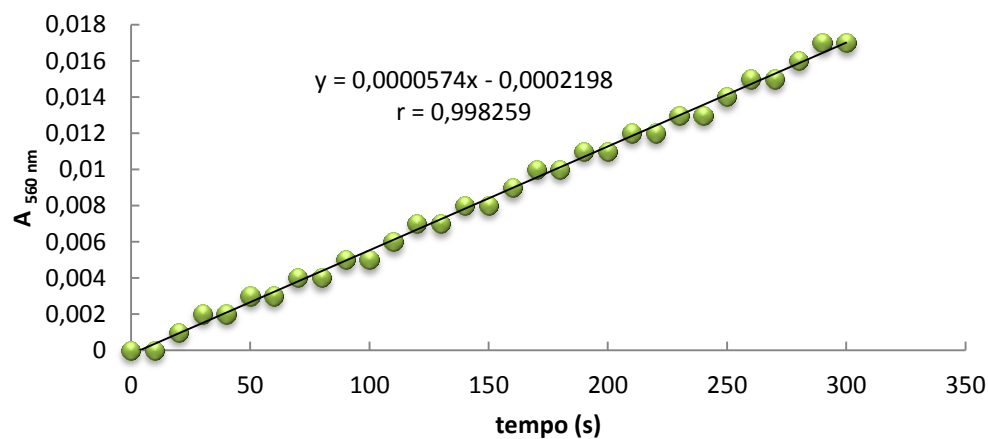
**Figura A21** – Representação gráfica da curva de reação do enzima glutationato peroxidase de maçã Bravo de Esmolfe no primeiro tempo de colheita.



**Figura A22** – Representação gráfica da curva de reação do enzima glutathione peroxidase de maçã *Starking* no primeiro tempo de colheita.

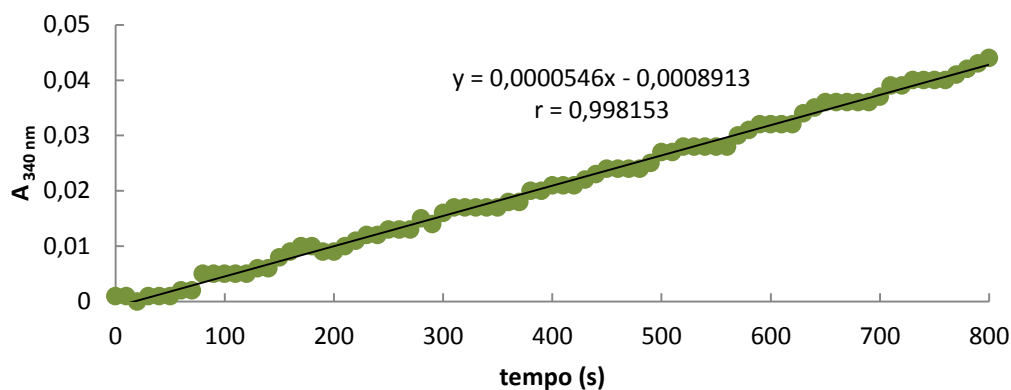


**Figura A23** – Representação gráfica da curva de reação do enzima superóxido dismutase de maçã *Bravo de Esmolfe* no segundo tempo de colheita.

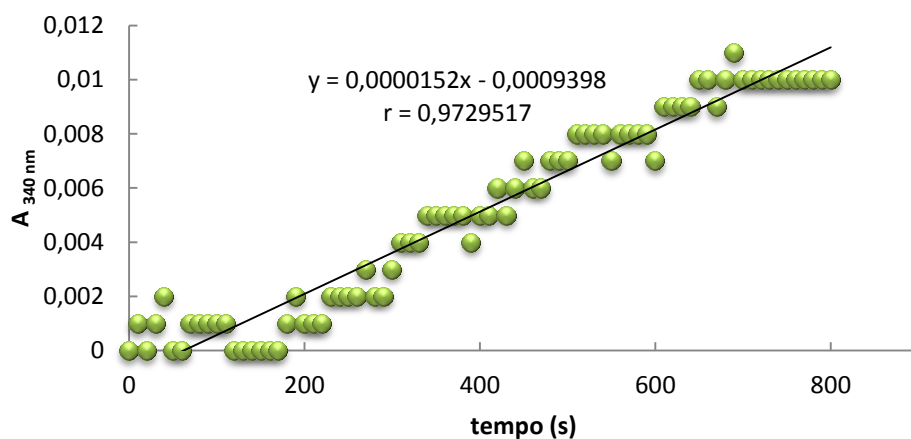


**Figura A24** – Representação gráfica da curva de reação do enzima superóxido dismutase de maçã *Starking* no segundo tempo de colheita.

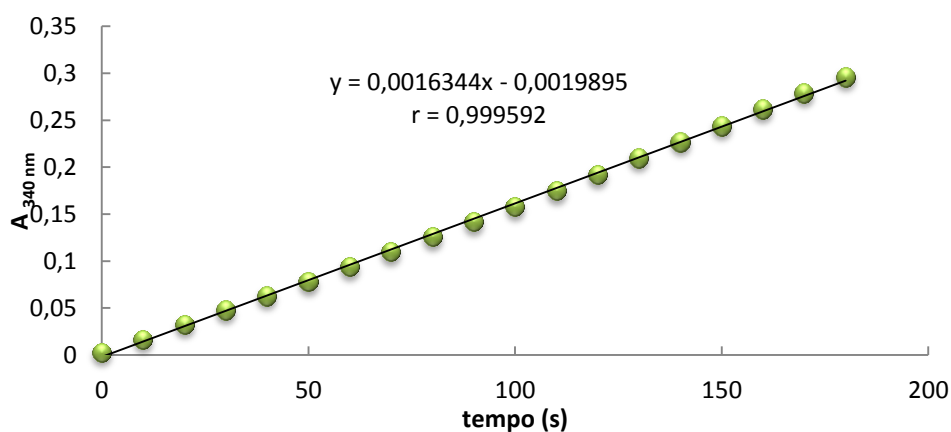




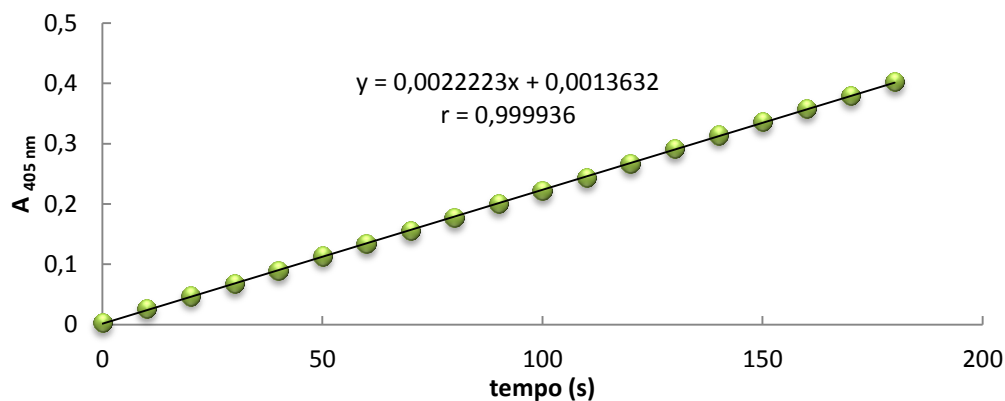
**Figura A25** – Representação gráfica da curva de reação do enzima glucose-6-fosfato desidrogenase de maçã Bravo de Esmolfe no segundo tempo de colheita.



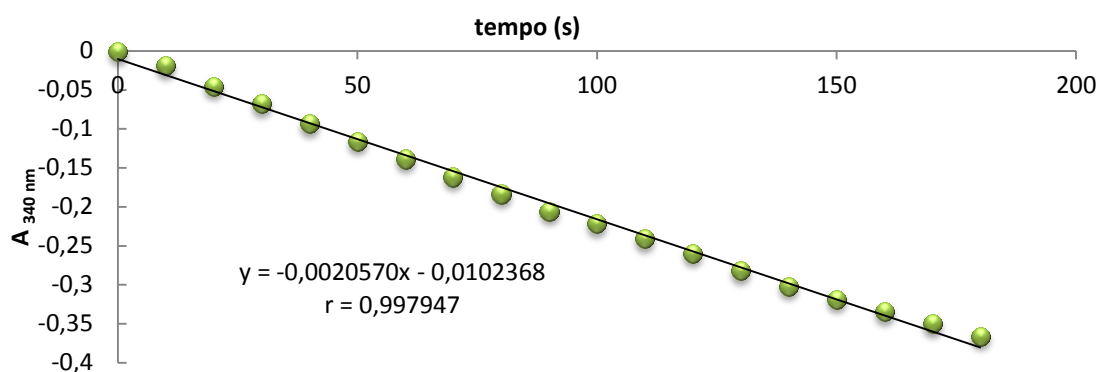
**Figura A26** – Representação gráfica da curva de reação do enzima glucose-6-fosfato desidrogenase de maçã Starking no segundo tempo de colheita.



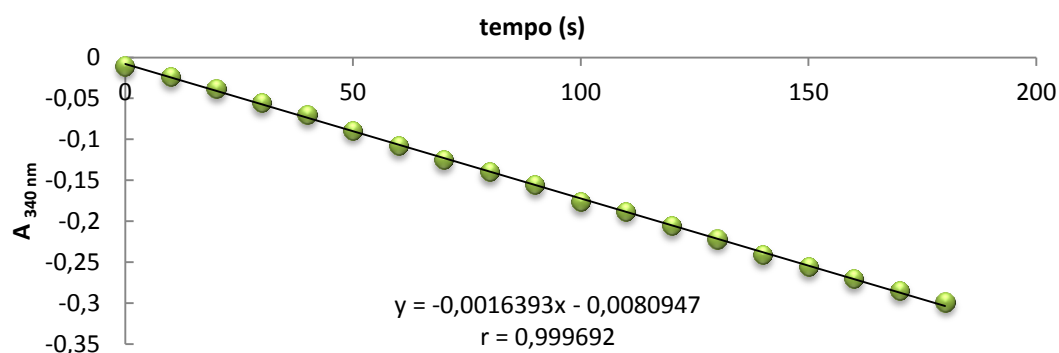
**Figura A27** – Representação gráfica da curva de reação do enzima fosfatase alcalina de sobrenadante pós-12000 g de *S. cerevisiae* BY4741, crescidas em meio YEPD, na presença de pentóxido de vanádio (2,0mM).



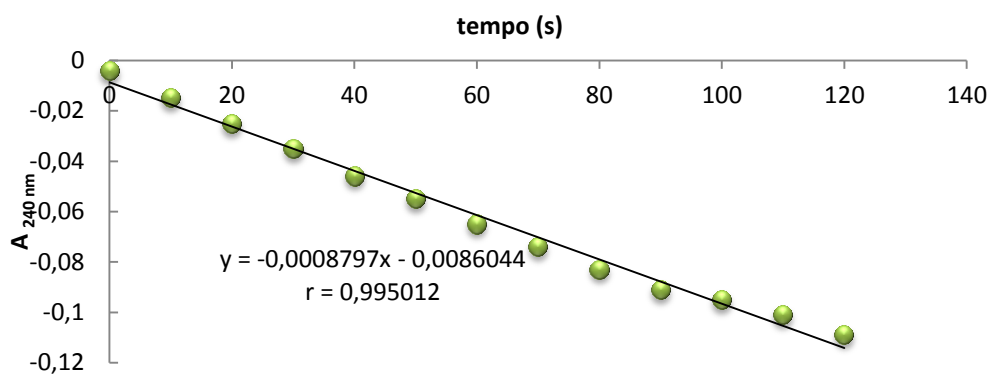
**Figura A28** – Representação gráfica da curva de reação do enzima fosfatase alcalina de sobrenadante pós-12000 g de *S. cerevisiae* BY4741, crescidas em meio YEPD, na presença de pentóxido de vanádio (2,0mM) e extrato de maçã Bravo de Esmolfe (5%).



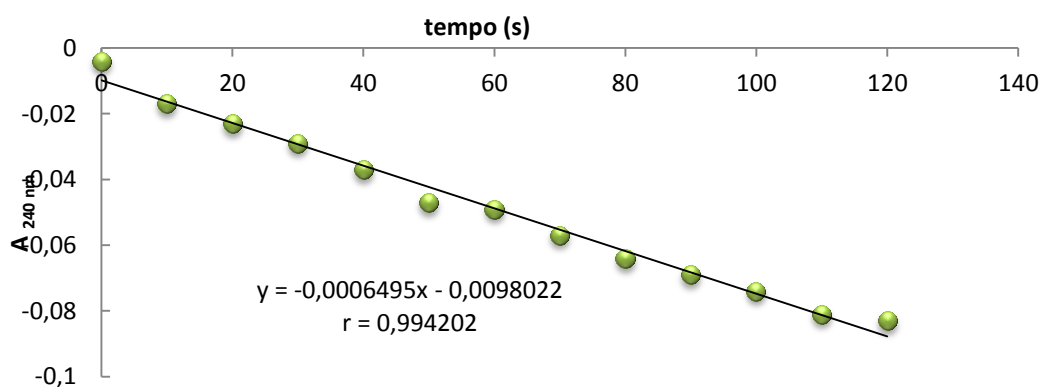
**Figura A29** – Representação gráfica da curva de reação do enzima glutationato redutase pós-12000 g de *S. cerevisiae* BY4741, crescidas em meio YEPD, na presença de pentóxido de vanádio (2,0mM) e extrato de maçã *Starking* (5%).



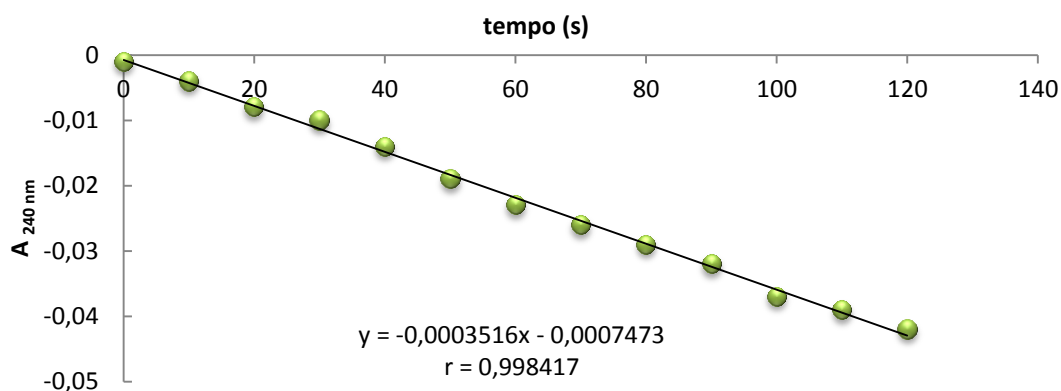
**Figura A30** – Representação gráfica da curva de reação do enzima glutationato redutase de sobrenadante pós-12000 g de *S. cerevisiae* BY4741, crescidas em meio YEPD, na presença de pentóxido de vanádio (2,0mM) e extrato de maçã *Golden Delicious* (5%).



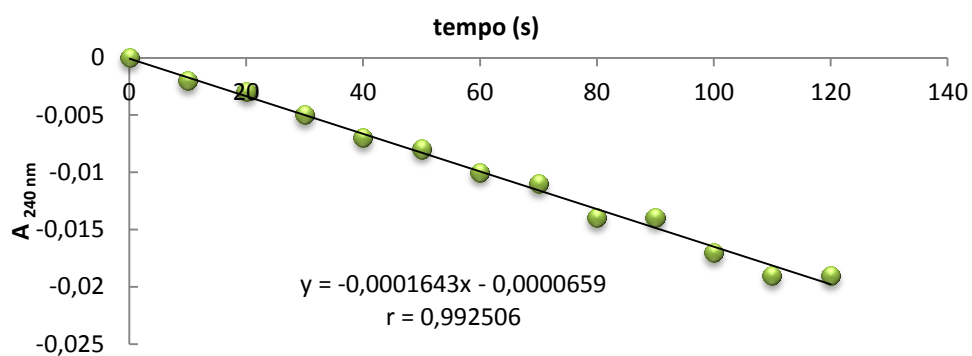
**Figura A31** – Representação gráfica da curva de reação do enzima catalase T de sobrenadante pós-12000 g de *S. cerevisiae* BY4741, crescidas em meio YEPD, na presença de pentóxido de vanádio (2,0mM) e extrato de maçã *Starking* (5%).



**Figura A32** – Representação gráfica da curva de reação do enzima catalase T de sobrenadante pós-12000 g de *S. cerevisiae* BY4741, crescidas em meio YEPD, na presença de pentóxido de vanádio (2,0mM) e extrato de maçã Bravo de Esmolfe (5%).



**Figura A33** – Representação gráfica da curva de reação do enzima catalase A de sedimento pós-12000 g de *S. cerevisiae* BY4741, crescidas em meio YEPD, na presença de pentóxido de vanádio (2,0mM) e extrato de maçã *Starking* (5%).



**Figura A34** – Representação gráfica da curva de reação do catalase A do sedimento pós-12000 g de *S. cerevisiae* BY4741, crescidas em meio YEPD, na presença de pentóxido de vanádio (2,0mM) e extrato de maçã Bravo de Esmolfe (5%).

**Quadro A1.** Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”), resultados obtidos por análise direta do extrato

	Origem de variância	Soma de quadrados	gl	Media quadrática	F	Sig.
TiaminaPolpa	Inter-grupos	7,244	5	1,449	33,4	0
	Intra-grupos	1,301	30	0,043		
	Total	8,545	35			
TiaminaCasca	Inter-grupos	77,265	5	15,453	3,596	0,011
	Intra-grupos	128,934	30	4,298		
	Total	206,199	35			
Riboflavinapolpa	Inter-grupos	745,385	5	149,077	9,378	0
	Intra-grupos	476,917	30	15,897		
	Total	1222,302	35			
Riboflavinacasca	Inter-grupos	4342,692	5	868,538	5,711	0,001
	Intra-grupos	4562,483	30	152,083		
	Total	8905,175	35			
GliTPolpa	Inter-grupos	520,339	5	104,068	0,956	0,46
	Intra-grupos	3266,811	30	108,894		
	Total	3787,15	35			
GliTCasca	Inter-grupos	6166,958	5	1233,392	6,372	0
	Intra-grupos	5806,767	30	193,559		
	Total	11973,725	35			
GliRedPolpa	Inter-grupos	0,093	5	0,019	3,202	0,02
	Intra-grupos	0,174	30	0,006		
	Total	0,266	35			
GliRedCasca	Inter-grupos	0,994	5	0,199	30,695	0
	Intra-grupos	0,194	30	0,006		
	Total	1,188	35			
FenóisPolpaÁgua	Inter-grupos	17691,484	5	3538,297	44,455	0
	Intra-grupos	2387,771	30	79,592		
	Total	20079,255	35			
FenóisCascaÁgua	Inter-grupos	134444,371	5	26888,874	54,784	0
	Intra-grupos	14724,368	30	490,812		
	Total	149168,739	35			
FenóisPolpaEtanol	Inter-grupos	28745,036	5	5749,007	18,058	0
	Intra-grupos	9550,917	30	318,364		
	Total	38295,953	35			
FenóisCascaEtanol	Inter-grupos	52571,582	5	10514,316	15,567	0
	Intra-grupos	20262,611	30	675,42		
	Total	72834,193	35			
DPPHPolpaÁgua	Inter-grupos	40,37	5	8,074	21,298	0
	Intra-grupos	11,373	30	0,379		
	Total	51,743	35			
DPPHCascaÁgua	Inter-grupos	494,738	5	98,948	23,809	0
	Intra-grupos	124,675	30	4,156		
	Total	619,413	35			
DPPHPolpaEtanol	Inter-grupos	472,259	5	94,452	31,662	0
	Intra-grupos	89,493	30	2,983		
	Total	561,751	35			
DPPHCascaEtanol	Inter-grupos	750,278	5	150,056	19,913	0
	Intra-grupos	226,072	30	7,536		
	Total	976,349	35			
FRAPPolpa	Inter-grupos	2612,321	5	522,464	83,664	0
	Intra-grupos	187,343	30	6,245		
	Total	2799,665	35			
FRAPcasca	Inter-grupos	43072,804	5	8614,561	63,288	0
	Intra-grupos	4083,527	30	136,118		
	Total	47156,331	35			

	Origem de variância	Soma de quadrados	gl	Media quadrática	F	Sig.
Ascorbatopolpa	Inter-grupos	44,151	5	8,83	22,7	0
	Intra-grupos	11,67	30	0,389		
	Total	55,821	35			
AscorbatoCasca	Inter-grupos	1567,647	5	313,529	17,743	0
	Intra-grupos	530,106	30	17,67		
	Total	2097,752	35			
GSH	Inter-grupos	523,599	5	104,72	34,039	0
	Intra-grupos	92,294	30	3,076		
	Total	615,893	35			
GSSG	Inter-grupos	288,907	5	57,781	108,346	0
	Intra-grupos	15,999	30	0,533		
	Total	304,906	35			
soma	Inter-grupos	229,82	5	45,964	82,013	0
	Intra-grupos	16,813	30	0,56		
	Total	246,633	35			
razão	Inter-grupos	232,136	5	46,427	730,227	0
	Intra-grupos	1,907	30	0,064		
	Total	234,043	35			
Prolina	Inter-grupos	1601523,842	5	320304,768	8,398	0
	Intra-grupos	1144249,34	30	38141,645		
	Total	2745773,182	35			
SDH	Inter-grupos	1708790,593	5	341758,119	4,954	0,002
	Intra-grupos	2069736,474	30	68991,216		
	Total	3778527,067	35			
PDH	Inter-grupos	528,415	5	105,683	2,726	0,038
	Intra-grupos	1162,909	30	38,764		
	Total	1691,324	35			
POD	Inter-grupos	0,002	5	0	4,413	0,004
	Intra-grupos	0,003	30	0		
	Total	0,005	35			
GPx	Inter-grupos	20921,444	5	4184,289	5,493	0,001
	Intra-grupos	22851,369	30	761,712		
	Total	43772,813	35			
SOD	Inter-grupos	760,75	5	152,15	8,368	0
	Intra-grupos	545,46	30	18,182		
	Total	1306,209	35			
G6PD	Inter-grupos	8,141	5	1,628	8,611	0
	Intra-grupos	5,673	30	0,189		
	Total	13,813	35			

**Quadro A2.** Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”), resultados obtidos nos ensaios com *S. cerevisiae*

		Soma de quadrados	gl	Media quadrática	F	Sig.
ps	Inter-grupos	28021,215	4	7005,304	49,722	0
	Intra-grupos	1408,889	10	140,889		
	Total	29430,104	14			
cfu	Inter-grupos	1,98933E+14	4	4,97333E+13	15,224	0
	Intra-grupos	3,26667E+13	10	3,26667E+12		
	Total	2,316E+14	14			
GSH	Inter-grupos	368217,19	4	92054,297	166,657	0
	Intra-grupos	5523,587	10	552,359		
	Total	373740,776	14			
GSSG	Inter-grupos	1096015,68	4	274003,92	1472,301	0
	Intra-grupos	1861,059	10	186,106		
	Total	1097876,739	14			
Soma	Inter-grupos	490334,636	4	122583,659	36033,11	0
	Intra-grupos	34,02	10	3,402		
	Total	490368,656	14			
Razão	Inter-grupos	20,195	4	5,049	29635,93	0
	Intra-grupos	0,002	10	0		
	Total	20,196	14			
ROS	Inter-grupos	13739,97	4	3434,993	479,318	0
	Intra-grupos	71,664	10	7,166		
	Total	13811,634	14			
MDA	Inter-grupos	2754,384	4	688,596	211,926	0
	Intra-grupos	32,492	10	3,249		
	Total	2786,876	14			
GPx	Inter-grupos	1418,259	4	354,565	25,254	0
	Intra-grupos	140,397	10	14,04		
	Total	1558,657	14			
ALP	Inter-grupos	24,68	4	6,17	11,538	0,001
	Intra-grupos	5,347	10	0,535		
	Total	30,028	14			
GR	Inter-grupos	458,048	4	114,512	8,171	0,003
	Intra-grupos	140,148	10	14,015		
	Total	598,196	14			
CATA	Inter-grupos	587,295	4	146,824	23,521	0
	Intra-grupos	62,423	10	6,242		
	Total	649,718	14			
CATT	Inter-grupos	394,932	4	98,733	59,065	0
	Intra-grupos	16,716	10	1,672		
	Total	411,648	14			