

COMPOSTOS ANTIOXIDANTES DE EXTRATO DE MAÇÃ, CULTIVAR GALA, PROMOVEM DIMINUIÇÃO DA VIABILIDADE DE MELANOMA EM CULTURA E INDUZEM MORTE CELULAR VIA PROCESSO DE NECROSE

Fernanda Cardoso Teixeira¹; Elita Ferreira da Silveira; Fatima Terezinha Alves Beira; Francisco Augusto Burket Del Pino; Elizandra Braganhol² e Márcia Vizzotto³

¹ Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção - Universidade Federal de Pelotas – fe.t@hotmail.com

² Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção - Universidade Federal de Pelotas – elizbraganhol@yahoo.com.br

³ Embrapa Clima Temperado – marcia.vizzotto@cpact.embrapa.br

1. INTRODUÇÃO

A maçã (*Malus sp.*) é um pseudofruto da família *Rosaceae*, proveniente das regiões temperadas, e possui um dos maiores índices de cultivo em todo o mundo (GOULARTE et al., 1999). No Brasil, a produção de maçãs se desenvolveu em maior escala há pouco mais de 30 anos, com um padrão tecnológico elevado e bons resultados de qualidade, o que torna a maçã brasileira uma fruta apta a competir no mercado mundial. Com mais de 800 mil toneladas, a região Sul é a responsável por 99% desta produção. Da maçã produzida, cerca de 85% é consumida *in natura* e apenas 15% é industrializado (BRACKMANN et al., 1995; BENDER et al., 2001).

Na atualidade, a alimentação ganha um enfoque terapêutico e preventivo, atuando na promoção da saúde. Nesse contexto surge o conceito de alimento funcional, que não só tem a função de nutrição como também de fornecer outros benefícios ao indivíduo consumidor. As frutas são consideradas alimentos funcionais, já que apresentam em sua composição uma série de compostos bioativos, denominados fitoquímicos. Suas concentrações variam de acordo com a cultivar, ponto de colheita, armazenamento, processamento e parte da fruta analisada (ANZUATEGUI, 2009). Geralmente, os fitoquímicos identificados na maçã são os ácidos gálico, propilgalato e, principalmente, o ácido salicílico (WOLFE et al., 2003).

Atualmente, a preocupação com a saúde e com a qualidade de vida tem se tornado estímulo para pesquisas na área de alimentos. O consumo de maçãs tem sido associado à prevenção de doenças crônicas, proteção do DNA, redução do risco de doenças cardiovasculares e câncer (SOARES et al., 2008; YURI et al., 2009).

Há evidências comprovadas de que extratos de maçã inteira possuem atividade antioxidante e antiproliferativa em células tumorais em cultura. Conforme WOLFE et al. (2003), os estudos realizados com extrato de maçã com casca mostram-se eficazes para inibir o crescimento de células cancerígenas de fígado humano *HepG2*. LIU et al. (2009), demonstraram que extratos de maçã têm atividade antioxidante e antiproliferativa em câncer de cólon, fígado e mama *in vitro* de forma dose-dependente. Entretanto, pouco é conhecido sobre o efeito antiproliferativo dos antioxidantes presentes no extrato de maçã em cultura de melanoma.

O objetivo desse trabalho foi otimizar um processo de extração de compostos antioxidantes da maçã cultivar gala e avaliar a viabilidade celular de cultura de melanoma B16F10 frente ao extrato obtido utilizando o método do MTT e a dosagem da enzima lactato desidrogenase (LDH) para verificar o dano celular causado por esse extrato.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A otimização da extração de compostos antioxidantes da maçã foi realizada testando diversos parâmetros, incluindo a utilização de solventes puros ou em combinação, variação dos tempos de extração, maceração, temperatura e luminosidade. A presença de fenóis totais foi avaliada utilizando o reagente Folin-Ciocalteu e a atividade antioxidante foi determinada pelo método do DPPH.

A linhagem de melanoma de camundongo B16F10 foi cultivada em DMEM/10% SFB em estufa de CO₂ a 37°C. As células foram semeadas em placas de 96 poços e tratadas com o extrato de maçã gala nas concentrações de 0,5; 1,0; 5,0 e 10 mg/mL por 24, 48, 72 e 96 h. Após o tratamento, a viabilidade celular foi determinada pelo método do MTT e o dano celular foi determinado pela dosagem de LDH pelo método automatizado cinético de tempo fixo com kit comercial Labtest. Os dados foram analisados por ANOVA seguido pelo post hoc de Tukey.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

O solvente extrator com melhor rendimento foi o etanol, seguido de acetona e a mistura de solventes na proporção de 30% etanol:70% acetona (Tabela 1). Os parâmetros tempo de maceração, ausência ou presença de luz e ausência ou presença de refrigeração não influenciaram significativamente no teor de antioxidantes extraído. Nos ensaios biológicos, o extrato etanólico de maçã gala reduziu a viabilidade das culturas de melanoma em 20% e 40% em 48 h; 60% e 65% em 72 h; 57% e 55% em 96 h de tratamento nas doses de 0,5, 1,0 mg/mL, respectivamente, quando comparados ao controle. Curiosamente, doses maiores do extrato de maçã gala (5,0 e 10 mg/mL), não promoveram alteração da viabilidade das culturas de melanoma, indicando um efeito bifásico depende da concentração de antioxidantes presentes no extrato (Fig. 1). Paralelamente, foi realizada a dosagem da atividade da LDH no sobrenadante das culturas de melanoma controle ou tratadas com o extrato de maçã. Em acordo com os dados que indicam uma diminuição da viabilidade celular frente as concentrações de 0,5 e 1,0 mg/mL do extrato de maçã, foi verificado um aumento da atividade da LDH de aproximadamente 2 vezes quando comparado as células controle nessas concentrações, sugerindo uma possível morte por necrose (Fig. 2).

Tabela 1. Fenóis Totais e Atividade antioxidante da maçã para diferentes combinações de solventes extratores. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2010.

	Fenóis totais ¹	Atividade antioxidante ²
Etanol	196,5±11,8 _{cd}	3775,1±105,2 _{bc}
Etanol:água (70:30)	171,4±28,8 _d	3827,8±38,6 _{bc}
Etanol:água (50:50)	212,4±27,8 _{bcd}	3892,2±993,2 _{ab}
Acetona	255,9±16,4 _b	2902,3±313,7 _{cd}
Acetona:água (70:30)	268,0±20,5 _{ab}	2348,3±263,3 _d
Acetona:água (50:50)	251,0±14,6 _{bc}	4646,0±206,6 _{ab}
Etanol:acetona (50:50)	211,6±24,1 _{bcd}	4365,4±228,0 _{ab}
Etanol:acetona (70:30)	215,1±36,3 _{bcd}	4794,7±
Etanol:acetona (30:70)	324,7±	4459,3±401,1 _{ab}

Média da quadruplicata ± desvio padrão. ¹ Fenóis = mg de ácido clorogênico/100g. ² Atividade = µg trolox/g. Média separadas em colunas e analisadas pelo teste Tukey com P ≤ 0.05.

Figura 1

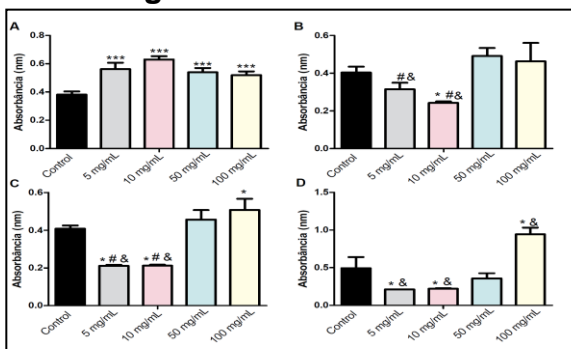


Figura 2

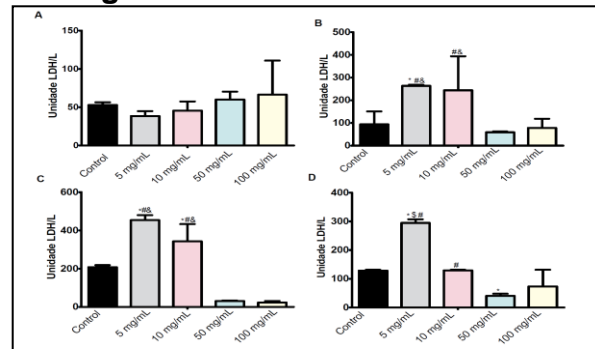


Figura 1. Efeito do tratamento com extrato de Maçã gala sobre a viabilidade celular de melanoma B16F10 em cultura avaliada pelo método do MTT. Dados expressos como média ± desvio padrão e analisados por ANOVA seguido de post-teste de Tukey. *significativamente diferente do grupo controle; # significativamente diferente do grupo 50 mg/mL; & significativamente diferente do grupo 100 mg/mL.

Figura 2. Efeito do tratamento com extrato de Maçã gala sobre a atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) em melanoma B16F10 em cultura. Dados expressos como média ± desvio padrão e analisados por ANOVA seguido de post-teste de Tukey. *significativamente diferente do grupo controle; \$ significativamente diferente do grupo 10 mg/mL; #significativamente diferente do grupo 50 mg/mL; & significativamente diferente do grupo 100 mg/mL.

4. CONCLUSÕES

Observa-se que a extração de compostos antioxidantes da maçã é influenciada pelos solventes extratores utilizados assim como pelas diferentes combinações destes. Em relação aos ensaios biológicos pode-se concluir que a redução da viabilidade celular no teste do MTT e, paralelamente, o aumento na dosagem de LDH, sugerem que o extrato de maçã induz morte celular via processo de

necrose e apresenta promissora atividade antitumoral em cultura de melanoma. Estudos estão em andamento para melhor caracterizar o efeito antitumoral do extrato de maçã, bem como identificar as moléculas responsáveis por esse efeito.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANZUATEGUI, L.S.Y. **Análise *in vitro* da atividade antioxidante do suco e extrato de maçã em células RINm5f submetidas a diferentes condições de estresse oxidativo.** Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Estadual de Ponta Grossa. Paraná. 2009.

BENDER, R. J.; LUNARDI, R. Perdas qualitativas de maçãs cv. Gala em armazenamento refrigerado. **Revista Brasileira de Fruticultura.** Jaboticabal-SP. v. 23 nº. 3. Dezembro - 2001.

BRACKMANN, A.; SAQUET, A.A. Efeito das condições de atmosfera controlada sobre a ocorrência de degenerescência em maçã 'Fuji'. **Scientia Agricola.** Piracicaba- SP. v. 52 nº. 2 Piracicaba Maio-agosto, 1995.

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

GOULARTE, V. D. da S., ANTUNES, P. L. Caracterização físico química de maçãs fuji concentradas com açúcares e desidratadas. **Revista Brasileira de Agrociência.** Pelotas- RS v.5 nº. 2, p.149-151. Maio-agosto, 1999.

LIU; J.; DONG; H.; CHEN, B.; ZHAO, P.; LIU, R. Fresh Apples Suppress Mammary Carcinogenesis and Proliferative Activity and Induce Apoptosis in Mammary Tumors of the Sprague-Dawley Rat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** Washington. v.57, p.297–304, 2009.

SOARES, M.; WELTER, L.; GONZAGA, L.; LIMA, A.; MANCINI FILHO, J.; FELT, R. Avaliação da atividade antioxidante e identificação dos ácidos fenólicos presentes no bagaço de maçã CV GALA. **Ciência Tecnologia de Alimentos.** Campinas, vol.28, nº. 3, 2008.

SWAIN, T.; HILLIS, W. E. The phenolic constituents of *Prunus domestica* L.- The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science Food and Agriculture.** Oxford, v.10, p.63-68, 1959.

Wolfe, K.; Wu, X.; Liu, R.H. Antioxidant activity of apple peels. **Journal of Agriculture and Food Chemistry.** Washington vol.51, p.609-614, 2003.

YURI, A. J.; NEIRA, A.; QUILODRAN, A.; MOTOMURA, Y.; PALOMO, I. Antioxidant activity and total phenolics concentration in apple peel and flesh is determined by cultivar and agroclimatic growing regions in Chile. **Journal of Food, Agriculture & Environment.** Finlândia. vol.7 (3&4), p.513–517, 2009.