

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GERONTOLOGIA BIOMÉDICA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA MAÇÃ FUJI *IN NATURA* E DESIDRATADA NO  
TEMPO DE VIDA E EM INDICADORES DO METABOLISMO E DA FISIOLOGIA  
DE *Drosophila melanogaster***

**DENISE CARVALHO**

Porto Alegre, Abril de 2004.

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GERONTOLOGIA BIOMÉDICA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA MAÇÃ FUJI *IN NATURA* E DESIDRATADA NO  
TEMPO DE VIDA E EM INDICADORES DO METABOLISMO E DA FISIOLOGIA  
DE *Drosophila melanogaster***

Tese submetida ao corpo docente do Programa de Pós-graduação em Gerontologia Biomédica da PUCRS, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutora em Gerontologia Biomédica.

**DENISE CARVALHO**

Orientadora: Profa. Dra. Ivana Beatrice Mânica Da Cruz

Porto Alegre, Abril 2004.

*Se deres as costas à luz, nada mais verás do que a tua própria  
sombra.*

*Zákind Piatigórsky*

*“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo,  
qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.”*

*À ELE, o meu eterno louvor.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Francisco, meu adorado filho e amigo, companheiro de todas as horas e momentos, cúmplice de todo o meu percurso desde o dia em que foi gerado. Obrigada por toda a garra e sabedoria que me passas...

Aos meus pais, por todo o apoio, incentivo, apostas e certeza de que nada seria tão impossível quanto parecia ser. Sem palavras...

À minha vovó, um exemplo de vida, de velhice, de entusiasmo pela vida e da vontade de viver!

As minhas irmãs, pelo apoio incondicional, pela cumplicidade e amizade.

À minha amiga e orientadora Ivana Mânica da Cruz, o meu eterno orgulho e agradecimento para a amiga que acreditou em mim como profissional. Um exemplo de mulher, mestre, guerreira, sábia, solidária e perspicaz.

À minha tia Clarice, que a cada dia nos mostra o quanto é importante acreditarmos em nós mesmos, agradeço a oportunidade de ter viabilizado alguns de meus sonhos com sua grandeza interior e sua demonstração de luta pela vida!

Ao Instituto de Geriatria e Gerontologia da PUCRS.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Gerontologia Biomédica por todo o carinho e simplicidade durante estes trinta meses de convívio.

Aos integrantes do Laboratório de Bioquímica e Genética Molecular do IGG-PUCRS que mesmo com alguns bons metros de distância sempre estiveram mais

perto do que imaginava. Com certeza estreitaremos a parceria que começou modesta...

À minha amiga Nutr. Neide Bruscato, sem sombra de dúvida, minha guia, e alavanca para que todo esse estudo fosse realizado da melhor maneira possível. Minha eterna gratidão !

A minha amiga e colega Dra. Carla Schwanke, parceira e incentivadora de toda essa trajetória; dos momentos de alegria, tristeza, apreensão e incertezas o meu agradecimento e reconhecimento.

Às minhas alunas e amigas Cláudia, Gabriela, Helena e Maíra, acadêmicas da FAENFI-PUCRS por todo o empenho, amizade e desprendimento que demonstraram durante o desenvolvimento do experimento. Meu muito obrigada!

À Dra. Guendalina Turcato Oliveira, professora de Fisiologia da FABIO da PUCRS que de maneira profissional e cooperativa viabilizou a execução da parte fisiológica do experimento juntamente com a acadêmica de Farmácia Industrial Bibiana Kaiser Dutra e o Biólogo Felipe Amorim Fernandes que tiveram papel fundamental na execução dessa etapa.

Aos meus companheiros(as) do dia-a-dia, dos pequenos detalhes, dos grandes e reservados momentos de aflição, das muitas horas de reflexões e labuta, das corajosas proezas que arriscamos, o meu muito obrigada pela cumplicidade de podermos viver tudo isso.

Ao meu tio Ney, que demonstrou sempre muita força de vontade para tornar real seus sonhos e que com seu ombro amigo me ajudou a fazer do meu sonho uma realidade.

Ao órgão financiador CAPES pela concessão da bolsa de pesquisa para o curso de doutoramento do PPG-IGG.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>9</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>11</b>
<b>RESUMO</b>	<b>12</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>13</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b>	<b>21</b>
<b>2.1 ENVELHECIMENTO POPULACIONAL</b>	<b>21</b>
<b>2.2 ENVELHECIMENTO BIOLÓGICO</b>	<b>23</b>
<b>2.3 ESPÉCIES ATIVAS DE OXIGÊNIO, DANO OXIDATIVO, ENVELHECIMENTO E DOENÇAS</b>	<b>29</b>
<b>2.4 MECANISMOS DE DEFESA ANTIOXIDANTES E REPARO DO ESTRESSE OXIDATIVO</b>	<b>36</b>
<b>2.5 ALIMENTO FUNCIONAL</b>	<b>41</b>
<b>2.5.1 Requisitos para que um alimento seja considerado funcional</b>	<b>45</b>
<b>2.5.2 Etapas necessárias em pesquisas buscando evidências científicas para comprovação da alegação de propriedade funcional ou de saúde</b>	<b>46</b>
<b>2.5.3 Componentes Bioativos</b>	<b>48</b>
<b>2.5.3.1 VEGETAL</b>	<b>49</b>
<b>2.5.3.2 ANIMAL</b>	<b>53</b>
<b>2.5.4 FLAVONÓIDES</b>	<b>57</b>
<b>2.5.4.1 Aspectos Gerais dos Flavonóides</b>	<b>57</b>
<b>2.5.4.2 Aspectos Nutricionais dos Flavonóides</b>	<b>59</b>
<b>2.5.4.3 Absorção e Metabolismo dos Flavonóides</b>	<b>60</b>
<b>2.5.4.4 Biodisponibilidade dos Flavonóides</b>	<b>61</b>
<b>2.5.5 MAÇÃ FUJI COMO ALIMENTO FUNCIONAL</b>	<b>62</b>
<b>2.5.5.1 Análise Bromatológica da Maçã Fuji</b>	<b>64</b>
<b>2.6 <i>Drosophila melanogaster</i> COMO MODELO EXPERIMENTAL</b>	<b>66</b>
<b>3 OBJETIVOS</b>	<b>70</b>
<b>3.1 OBJETIVO GERAL</b>	<b>70</b>
<b>3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>70</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>72</b>

<b>4.1.DELINEAMENTO</b>	72
<b>4.2.POPULAÇÃO E AMOSTRA</b>	72
<b>4.3.MEIO DE CULTURA PARA A CRIAÇÃO E INVESTIGAÇÃO</b>	73
4.3.1 Protocolo para o Meio de Cultura Padrão	73
4.3.2 Protocolo para Meio de Ovoposição Vermelho	74
<b>4.4 VARIÁVEIS INVESTIGADAS</b>	74
4.4.1 Análise das Variáveis Demográficas: longevidade	75
4.4.2 Dosagem de Lipídios e Triglicerídios Teciduais	76
<b>4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA</b>	77
<b>5 RESULTADOS</b>	80
5.1 Indicadores Demográficos de Longevidade nos Tratamentos	80
5.2 Efeito dos Tratamentos a Base de Maçã Associados ao Envelhecimento com Relação aos Parâmetros Metabólicos de <i>Drosophila melanogaster</i>	88
<b>6 DISCUSSÃO</b>	112
6.1 Efeito do tratamento da maçã na longevidade/mortalidade	113
6.2 Efeito da maçã nas variáveis metabólicas investigadas	117
6.3 Associação entre tratamento com maçã e indicadores do estresse oxidativo	122
6.4 Considerações sobre o papel <i>D. melanogaster</i> da maçã no envelhecimento e longevidade	127
<b>7 CONCLUSÃO</b>	130
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	132
<b>APÊNDICE</b>	154

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Componentes, fontes e benefícios à saúde dos alimentos funcionais. 55
- Figura 2.** Esquema da estrutura geral dos Flavonóides. 59
- Figura 3.** Evolução do consumo per capita no Brasil nos últimos dezoito anos. 63
- Figura 4.** USDA Nutrient Database for Standard Reference, Release (13 november 1999). 64
- Figura 5.** Distribuição da mortalidade em números absolutos de fêmeas de *Drosophila melanogaster* por dia nos diferentes tratamentos. 81
- Figura 6.** Distribuição da mortalidade em números absolutos de machos de *Drosophila melanogaster* por dia nos diferentes tratamentos. 82
- Figura 7.** Comparação entre a longevidade máxima de machos e fêmeas de *Drosophila melanogaster* desenvolvidos em diferentes dietas. 85
- Figura 8.** Análise da função de sobrevivência pelo teste estatístico de Kaplan-Meir. 88
- Figura 9.** Comparação das medianas dos níveis de lipídios totais (mg/g) nas diferentes idades em fêmeas tratadas com maçã (letras iguais em cada dieta não apresentam diferenças significativas entre as idades). 90
- Figura 10.** Comparação das medianas dos níveis de triglicerídios (mg/g) nas diferentes idades em fêmeas tratadas com maçã (letras iguais em cada tratamento não apresentam diferenças significativas entre as idades). 91
- Figura 11.** Comparação das medianas dos níveis de glicogênio (mg/g) nas diferentes idades em fêmeas tratadas com maçã (letras iguais em cada

tratamento não apresentam diferenças significativas entre as idades).	92
<b>Figura 12.</b> Comparação das medianas dos níveis proteínas totais (mg/ml) nas diferentes idades em fêmeas tratadas com maçã (letras iguais em cada tratamento não apresentam diferenças significativas entre as idades).	93
<b>Figura 13.</b> Comparação das medianas dos níveis TBA (unid) nas diferentes idades em fêmeas tratadas com maçã (letras iguais em cada tratamento não apresentam diferenças significativas entre as idades).	94
<b>Figura 14.</b> Comparação das medianas dos níveis lipídicos (mg/g) nas diferentes idades em machos tratados com maçã (letras iguais em cada tratamento não apresentam diferenças significativas entre as idades).	95
<b>Figura 15.</b> Comparação das medianas dos níveis de triglicerídios (mg/g) nas diferentes idades em machos tratados com maçã (letras iguais em cada tratamento não apresentam diferenças significativas entre as idades).	96
<b>Figura 16.</b> Comparação das medianas dos níveis de glicogênio (mg/g) nas diferentes idades em machos tratados com maçã (letras iguais em cada tratamento não apresentam diferenças significativas entre as idades).	97
<b>Figura 17.</b> Comparação das medianas dos níveis de proteína (mg/ml) nas diferentes idades em machos tratados com maçã (letras iguais em cada tratamento não apresentam diferenças significativas entre as idades).	98
<b>Figura 18.</b> Comparação das medianas dos níveis de TBA nas diferentes idades em machos tratados com maçã (letras iguais em cada tratamento não apresentam diferenças significativas entre as idades.)	99
<b>Figura 19.</b> Distribuição dos valores observados nas variáveis metabólicas investigadas em <i>Drosophila melanogaster</i> . KS= valor do teste de <i>Kolmogorov-Smirnof</i> para normalidade. Significância < 0,05 indica distribuição não normal.	110

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Expectativa de vida calculada a partir dos dados da tabela de vida de machos e fêmeas de <i>Drosophila melanogaster</i> nas diferentes dietas.	82
<b>Tabela 2.</b> Comparação entre a longevidade média de machos e de fêmeas de <i>Drosophila melanogaster</i> desenvolvidos em diferentes dietas.	85
<b>Tabela 3.</b> Comparação entre as medianas das variáveis metabólicas investigadas em fêmeas tratadas com maçã em diferentes idades.	100
<b>Tabela 4.</b> Comparação entre as medianas das variáveis metabólicas investigadas em machos tratados com maçã em diferentes idades.	106

## RESUMO

**Introdução:** o envelhecimento populacional gerou um aumento na prevalência de doenças crônico-degenerativas. Evidências científicas sugerem que existam fatores de risco associados aos hábitos alimentares. Por outro lado, diversos estudos apontam para os efeitos benéficos dos alimentos funcionais à saúde, como por exemplo, à maçã.

**Objetivos:** avaliar o efeito da Maçã Fuji (*in natura* e desidratada) como um alimento funcional na longevidade e em variáveis do metabolismo e da fisiologia da mosca-das-frutas *Drosophila melanogaster*.

**Materiais e Métodos:** moscas-das-frutas *Drosophila melanogaster* da linhagem Oregon-R foram utilizadas para a condução dos seguintes tratamentos: dieta de maçã *in natura* adicionada ao meio de cultura; dieta de maçã desidratada adicionada ao meio de cultura; sem dieta (controle). Adicionalmente foram testadas duas concentrações para cada tipo de tratamento: 10% e 20%. O estudo analisou a longevidade máxima, média e a taxa de mortalidade entre os tratamentos. Os níveis de colesterol, glicogênio, triglicerídeos, proteínas e de TBA que avalia o dano oxidativo, foram testados em cinco diferentes idades: um, cinco, dez, 15 e 20 dias.

**Resultados:** um total de 4599 moscas foram acompanhadas do nascimento a morte (2450 machos (53,3%) e 2149 (46,7%) fêmeas. Análise da longevidade e mortalidade (média e máxima) foi significativamente maior em machos e fêmeas tratados tanto com maçã *in natura* quanto chá. A análise dos indicadores do metabolismo variou segundo o tratamento e a idade tanto em machos quanto em fêmeas e os resultados obtidos, quando comparados com a literatura sugeriram que a variação dos níveis de lipídios, proteínas e TBA foram similares aos descritos para populações de *D. melanogaster* geneticamente selecionadas para maior longevidade.

**Conclusão:** os resultados obtidos sugerem que a maçã possui propriedades antioxidantes que podem ser atribuídas também aos compostos bioativos, que potencialmente podem atuar benéficamente no organismo modulando de modo diferencial o metabolismo e aumentando a longevidade do modelo experimental testado.

**PALAVRAS-CHAVE:** alimentos funcionais, antioxidantes, maçã Fuji, componentes bioativos, flavonóides, modelos experimentais, *Drosophila melanogaster*

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Population aging lead to an increase in the prevalence of cronic-degerative diseases. Scientific evidences suggests the existence of risk factors associated to alimentary habit. Otherwise, many studies suggest that the functional foods have benefic effects to health, such as, apple.

**OBJECTIVES:** Evaluate the effects of the *Fuji* Apple (*in natura* and dehydrated) in the longevity and in the physiologic metabolism variables of the fruit fly *Drosophila Melanogaster*. **MATERIAL AND METHODS:** Fruit flies *Drosophila Melanogaster* of the Oregon-R lineage was used in the conduction of the following experiments: diet of *in natura* apple added to the middle of the cultivation environment; diet of dehydrated apple added to the middle of the cultivation environment; no diet (control). Additionally, two concentrations for each type of treatment were tested: 10% and 20%. The study analyzed the maximum and medium longevity and the mortality rate among the treatments. The levels of cholesterol, glycogen, triglicerides, proteins and TBA that evaluates the oxidative damage, were tested at 5 different ages: one, five, ten, fifteen and twenty days.

**RESULTS:** A total of 4599 flies were accompanied from birth to death (2450 males (53,3%) and 2149 females (46,7%)). Analysis of mortality (maximum and medium) showed that it was significantly higher on males and females treated with the *in natura* apple and with the dehydrated apple. The analysis of the metabolism indicators varied in the treatment and in age in males and females and the obtained results, when compared to the existing literature, suggested that the variation in the lipids, proteins and TBA levels were similar to those described to populations of genetically selected to higher longevity *Drosophila melanogaster*.

**CONCLUSIONS:** The obtained results suggests that the apple contain antioxidants property that may be attribute also to bioactive compounds that can potentially act in a benefic way in the modulated organism and metabolism in a differential way increasing the longevity of the experimental subject tested.

**Key Words:** functional food, antioxidant, *Fuji* apple, bioactive compounds, flavonoids, experimental subjects, *Drosophila melanogaster*.



## 1 INTRODUÇÃO

O envelhecimento populacional vem chamando a atenção do mundo nas últimas décadas por ter como consequência o aumento no número absoluto e proporcional de idosos na população, bem como o aumento da expectativa média de vida ao nascer. Tal fenômeno acontece em decorrência da diminuição das taxas de natalidade/fertilidade na população e da mortalidade infantil, trazendo consigo também, uma mudança epidemiológica relacionada à prevalência das causas mais comuns de morbi-mortalidade.<sup>1,2</sup> Assim, nas últimas décadas houve um aumento na prevalência de doenças crônico-degenerativas, cuja grande maioria apresenta origem multifatorial, envolvendo interações genético-ambientais.<sup>3,4</sup>

A partir da década de 1960, evidências sugeriram que variáveis ambientais, especialmente os hábitos alimentares e a atividade física, poderiam estar relacionadas com doenças como as cardiovasculares e as neoplasias, entre outras. Atualmente, sabe-se que o estilo de vida pode funcionar como um modulador para o processo degenerativo, acelerando ou desacelerando o mesmo.<sup>5</sup> Como exemplo, temos o hábito do tabagismo que compromete a saúde estimulando a formação dos radicais livres, que são moléculas cujo elétron que se localiza nas camadas mais externas dos átomos encontra-se em desequilíbrio, reagindo, assim, com diversas

macromoléculas do organismo de proteínas a carboidratos, gerando alterações fisiológicas e genéticas significativas.<sup>6,7</sup>

Neste sentido, diversos estudos como o SENECA realizado em nove países da Europa, no qual foram acompanhados 2200 idosos entre 1988 e 1999, concluíram que a adoção de um estilo de vida saudável como o hábito de não fumar, a prática de atividade física regular e a alta qualidade da dieta contribuem para um envelhecimento bem sucedido. Em geral, quanto mais cedo se iniciar a prática do estilo de vida saudável e a manutenção do mesmo até idades avançadas, mais efetiva será a prevenção de doenças e disfunções. Contudo, a adoção de um estilo de vida saudável por idosos, também é efetivo.<sup>8</sup>

Revisando alguns conceitos em relação à alimentação e à reprodução (compreendida como sucessão biológica de gerações), pode-se dizer que ambas representam os processos básicos da vida. Isto porque a alimentação constitui o elo de ligação fundamental dos seres animados com seu ambiente físico, biótico e, no caso humano, seu hábitat social. Sob este aspecto, a alimentação e a nutrição configuram, com muita sensibilidade, a expressão do ajustamento de indivíduos e comunidades ao ecossistema no qual vivem.<sup>6</sup>

Como a nutrição é de grande relevância para os seres vivos, estudos realizados mostram que o equilíbrio nutricional é fundamental, não só para a manutenção da vida, mas também para a qualidade de vida livre de doenças. Assim, estados de desnutrição ou supernutrição são considerados fatores de risco para a saúde de qualquer organismo.

Por outro lado, muitas investigações sugerem que dietas ricas em frutas e vegetais possuem efeito protetor contra doenças. Isto porque, os alimentos de origem vegetal contêm, além de vitaminas, sais minerais e fibras, os compostos

bioativos que são representados pelo grande grupo dos fitoquímicos e seus sub-grupos, tais como flavonóides, ácidos fenólicos e polifenóis. Os compostos bioativos estão presentes nos denominados *alimentos funcionais*, cuja principal característica é o potencial efeito antioxidante natural.<sup>9, 10, 11</sup>

Cientistas do mundo inteiro se voltaram para observar os hábitos alimentares em países do Mediterrâneo, nos quais a expectativa de vida das pessoas mostrou-se maior do que em países desenvolvidos.

Em 1992, Renaud e De Lorgeril<sup>12</sup> realizaram um dos trabalhos mais famosos nesta área, demonstrando que havia uma menor incidência de doenças cardiovasculares na França em relação a outros países industrializados, apesar dos fatores de risco cardiovasculares como consumo de gordura saturada, nível de colesterol sérico, pressão arterial, índice de massa corporal, tabagismo e sedentarismo não serem menores. Esse fato foi denominado pelos autores como "Paradoxo Francês". As investigações apontaram que o alimento que conferia a proteção descrita seria o vinho tinto, cujos principais compostos bioativos existentes eram o resveratrol, a quercitina, a mirecitina e os taninos. Os autores então sugeriram que os mesmos eram os protagonistas desse paradoxo.

A partir de um conjunto razoável de evidências, pesquisadores principalmente do Japão, China e países da Comunidade Européia reconhecem que os alimentos que contêm compostos bioativos podem atuar na prevenção de doenças e na promoção da saúde. Desta forma, o alimento passou a ser visto como algo benéfico em termos de saúde e não somente como meio de sobrevivência, pois com o avanço das pesquisas sobre a identificação dos compostos bioativos foi possível identificar fatores de proteção à saúde e não somente os benefícios dos nutrientes classicamente definidos. Isto porque, tais componentes são capazes de estimular de

maneira positiva determinados sistemas biológicos, proporcionando um funcionamento orgânico mais saudável.<sup>11</sup>

Desta forma, os alimentos funcionais poderiam ser considerados como uma ferramenta alternativa ou um coadjuvante na prevenção, tratamento e melhora dos sintomas de doenças e disfunções associadas ao envelhecimento como a menopausa, osteoporose, alguns tipos de câncer e doenças cardiovasculares.

Dentro deste contexto, a partir de 1999, a legislação brasileira incorporou o conceito de alimentos funcionais através de seu órgão regulador a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), adotando atitudes tão rigorosas quanto a da legislação Japonesa e da Comunidade Européia, segundo normas do Ministério da Saúde. A legislação americana, ao contrário, inclui até mesmo suplementos dietéticos tais como cápsulas e tabletes, etc., na categoria de funcionais. Para a legislação brasileira, todo benefício à saúde atribuído a qualquer alimento considerado funcional, deverá ser comprovado com pesquisas científicas, não devendo de maneira alguma ser confundido com medicamentos.<sup>13</sup>

Segundo a Associação Brasileira de Cardiologia, que reconhece desde 1998 do papel dos flavonóides como potenciais antioxidantes naturais, está estabelecido que a potente atividade antioxidante se deve aos radicais fenólicos presentes. Os flavonóides estão em diversos alimentos de origem vegetal como *maçã*, uva, cebola, repolho, brócolis, chicória, aipo, chá e vinho tinto. A quercitina, principal flavonóide, é removedora dos radicais superóxido, oxigênio singlet e peróxidos lipídicos e inibe a oxidação das LDL e efeitos citotóxicos das VLDL oxidadas.<sup>14</sup> Como exemplo, temos o azeite óleo vegetal extraído da prensagem do fruto da oliveira, a azeitona, que traz inúmeros benefícios à saúde por ser fonte de gordura monoinsaturada, relacionada

à redução do LDL, conhecido como mau colesterol, sem reduzir as taxas de HDL, o bom colesterol.

No Brasil, devido a grande diversidade de hábitos alimentares, tanto em termos de tipos de alimentos quanto em termos de modo de preparo dos alimentos, faz-se necessária a implementação de investigações dos alimentos funcionais sobre a saúde/doença. Contudo, no Brasil, o número de investigações nessa área ainda pode ser considerado incipiente, uma vez que a sua implementação e desenvolvimento requer equipes científicas altamente habilitadas, especializadas e multidisciplinares.

Entretanto, apesar do desenvolvimento tecnológico dos últimos anos, na área dos alimentos funcionais ainda são necessárias investigações básicas que privilegiem o entendimento de como os compostos bioativos agem no organismo.

Cabe ressaltar que, com o avanço da idade, os requerimentos para alguns antioxidantes naturais podem estar aumentados.

A partir do conjunto destas evidências, estima-se, hoje, que a melhora significativa nos padrões alimentares de uma população, tem como consequência a promoção de saúde, longevidade e qualidade de vida.<sup>15</sup>

Apesar das evidências em seres humanos apontarem para a ação benéfica de compostos bioativos presentes em alimentos na longevidade e envelhecimento, investigações mais aprofundadas ficam limitadas a pressupostos éticos que impedem o estabelecimento de ensaios clínico-nutricionais de longa duração que comprovem tais benefícios. Dentro desta perspectiva, o uso de modelos experimentais, amplamente utilizados na pesquisa básica, é de grande utilidade para a coleta de evidências de como tais compostos podem estar agindo na fisiologia e biologia do envelhecimento. Por tal motivo, o estudo aqui realizado foi conduzido

com a mosca-das-frutas *Drosophila melanogaster* que é um modelo experimental mundialmente utilizado.<sup>13</sup>

O princípio de Hipócrates de aproximadamente 2.500 anos atrás “Faça do seu alimento o seu medicamento e do medicamento o seu alimento” é norteador do presente estudo, buscando com isso confirmações científicas em pesquisas que possam contribuir para possíveis formas futuras de prevenção primária de saúde aplicáveis ao ser humano.

---

*REFERENCIAL TEÓRICO*

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 ENVELHECIMENTO POPULACIONAL

Por que hoje, cada vez mais, a ciência e a sociedade interessam-se pelo envelhecimento e pela pessoa idosa? Porque está ocorrendo um fenômeno chamado “envelhecimento populacional”. Nas últimas décadas, as populações passaram a experimentar um envelhecimento substancial, devido à diminuição da mortalidade infantil e da taxa de fecundidade. Adicionalmente, as políticas de saúde, ao longo dos tempos, conseguiram um controle relativo de doenças infecto-contagiosas, a melhoria de condições de saneamento básico, avanços técnico-científicos na área biomédica (como o desenvolvimento de medicações), levando à melhoria da qualidade de vida em geral. Assim, o crescimento da população idosa no mundo atual passa a exigir com urgência o estabelecimento de políticas sociais que promovam o bem-estar e o viver digno dessas pessoas.<sup>16, 17</sup>

Desse modo, o envelhecimento populacional coloca-se como um desafio crescente às demandas sociais do país, visto que, tendências mundiais da diminuição da fecundidade e de aumento na esperança de vida têm contribuído decisivamente para um aumento da população com mais de 60 anos numa velocidade jamais registrada. Com isso, uma nova demografia está surgindo para a espécie humana. Estudos biodemográficos unindo biologia e demografia das

espécies poderão subsidiar nosso entendimento sobre o envelhecimento e a longevidade.<sup>3, 18</sup>

A partir da década de 1970, constatou-se no Brasil um crescimento considerável do contingente populacional de indivíduos com mais de 60 anos. Assim, o país está cada vez mais preocupado com seus idosos, pois começou a viver este fenômeno recentemente, com uma velocidade muito rápida quando comparado a outros países e mais uma vez a sociedade como um todo não está preparada para enfrentar mais esta mudança.<sup>19</sup>

Tradicionalmente, o grupo etário “idoso” tem sido definido pela Organização Mundial da Saúde como uma população acima de 65 anos e representa cerca de 20% da população mundial. No entanto, em países sub-desenvolvidos e em desenvolvimento como é o caso do Brasil, consideram-se idosos pessoas que encontram-se a partir dos 60 anos de idade.<sup>20</sup>

Acompanhando o processo de envelhecimento, está associado o aumento da prevalência das doenças crônico-degenerativas e suas seqüelas. As doenças cardiovasculares, por exemplo, tornam-se a principal causa de incapacitação e de morte na população idosa da maioria dos países industrializados. No Rio Grande do Sul, as doenças do aparelho circulatório também são a principal causa de morte para a faixa etária acima dos 40 anos de idade.

Contudo, o envelhecimento é um processo normal, inerente a todos os seres vivos, sendo impossível revertê-lo ou pará-lo, ainda que o mesmo possa ser modulado por fatores ambientais. Caracteriza-se por mudanças morfofuncionais que ocorrem ao longo da vida, após a maturação sexual, que comprometem a capacidade de resposta do indivíduo ao estresse ambiental e a manutenção da homeostasia corporal. Como exemplo destas alterações, temos o aparecimento da

queda de cabelo, diminuição da audição, menopausa em mulheres, alterações de órgãos, tecidos e células afetando sistemas como o cardiovascular, endócrino e imunológico, não significando doença.<sup>21</sup>

Assim, investigações relacionadas com os hábitos alimentares e o aparecimento de morbidades parecem ser de fundamental importância para as próximas décadas, contribuindo para a diminuição do aparecimento de doenças crônico-degenerativas. Isto porque o envelhecimento contempla modificações orgânicas que serão comentadas a seguir, que aumentam a suscetibilidade a doenças.<sup>5</sup>

## **2.2 ENVELHECIMENTO BIOLÓGICO**

Envelhecimento biológico, ou senescência para alguns autores, pode ser definido como um decréscimo progressivo na capacidade fisiológica e na habilidade do organismo em responder ao estresse ambiental com o passar do tempo, tornando o indivíduo mais suscetível e vulnerável às doenças.<sup>22</sup>

Para muitos autores, o período biológico da velhice começa após o período reprodutivo. Entretanto, modificações corporais, tanto em nível metabólico quanto em nível morfológico são altamente heterogêneas, tanto de pessoa para pessoa, quanto entre diferentes grupos étnicos. Torna-se impossível medir envelhecimento de qualquer tipo de organismo, pois a idade cronológica não é um meio seguro para medir este processo. Desse modo, faz-se necessário a busca de parâmetros biológicos que se modifiquem em função do tempo e que possam ser mensuráveis e comparáveis intra e inter-especificamente.<sup>23, 24</sup>

Muitas teorias têm sido elaboradas na tentativa de explicar o envelhecimento, entretanto, todas acreditam que em algum nível (maior ou menor) o meio ambiente afeta este processo biológico.

Strehler<sup>25</sup> salienta que para uma teoria do envelhecimento ser aceita ela precisa necessariamente contemplar características como:

- ser deletéria: o fator desencadeante deve reduzir a funcionalidade corporal ao longo do tempo;
- ser progressiva: modificações e redução da funcionalidade devem ser graduais;
- ser intrínseca: modificações e redução da funcionalidade não devem ser resultado direto de um componente ambiental;
- ser universal: modificações e redução devem ocorrer similarmente ao longo da idade, ainda que precoce ou tardiamente, em todos os indivíduos da mesma espécie.

Segundo Arking<sup>26</sup> as teorias do envelhecimento podem ser agrupadas em duas grandes categorias, levando em consideração eventos intra e intercelulares :

**a) Teorias sistêmicas ou da genética do desenvolvimento (intrínsecas):** definem o envelhecimento como sendo parte de uma programação genética específica determinada, podendo ser modulado (acelerado/desacelerado) por fatores ambientais. A principal base explicativa para a evolução da programação genética do envelhecimento baseia-se na idéia de que o mesmo conjunto de genes que poderiam se expressar em fases precoces da vida (principalmente no desenvolvimento inicial, como a embriogênese) de modo benéfico, poderiam ter efeitos negativos no período pós-reprodutivo, determinando o envelhecimento.

Entre as teorias genéticas mais conhecidas, destacam-se: o antagonismo pleiotrópico, genes da longevidade, síndromes do envelhecimento acelerado, teoria neuroendócrina, teoria imunológica, senescência celular e morte celular.

**b) Teorias estocásticas (extrínsecas ):** definem o envelhecimento como sendo causa de eventos ao acaso, levando ao acúmulo de danos com deterioração orgânica; não existiria um mecanismo pré-determinado. Baseia-se no fato de que a pressão seletiva é próxima a zero. Dessa forma, embora aconteçam mutações que tornem um determinado indivíduo mais longo ou mais frágil a doenças, a possibilidade de passar estas variações para as próximas gerações seria nula ou muito pequena, já que as mesmas acontecem depois do período reprodutivo.

Entre as teorias estocásticas mais conhecidas, destacam-se: a teoria da mutação somática e reparo do DNA, do erro catastrófico, da modificação protéica ou metabólica e do estresse ou dano oxidativo.

Uma das teorias estocásticas mais relevantes é a **teoria do dano oxidativo**, primeiramente proposta por Harman.<sup>27</sup> O autor relata que o estresse oxidativo desencadeado pelos radicais livres, comumente denominados de espécies ativas de oxigênio (EAOs), seria o principal fator desencadeante do envelhecimento, fundamentando a chamada Teoria dos Radicais Livres para o Envelhecimento. Estudos confirmam que os EAOs, além de promoverem aparecimento de manchas na pele com o avançar da idade, também causam danos ao DNA das células com o estabelecimento de ligações cruzadas em algumas moléculas.

Entretanto, hoje existe uma tendência em explicar o envelhecimento como sendo resultado de interações genético-ambientais.

Acredita-se também que os fatores genéticos exerçam grande influência, assim como a teoria das proteínas ou metabólica, que postula que animais com

estrutura maior apresentam uma longevidade maior do que espécies de menor tamanho e, que a taxa metabólica seria inversamente proporcional ao peso corpóreo. Assim, a associação entre longevidade e metabolismo preconiza uma relação causal, pois estudos demonstram que em alguns organismos, alterações metabólicas induzidas por fatores ambientais (temperatura/dieta) poderiam produzir mudanças correspondentes na longevidade, já que a taxa metabólica tende a diminuir com a idade.<sup>28</sup>

Dentro da imensa gama de questões relacionadas com a biologia de espécies animais, o envelhecimento e a morte possuem um destaque especial. Ainda que tais processos biológicos sejam naturais, os quais começam na concepção e terminam na morte, pode-se dizer que são pouco conhecidos. Sabe-se que o envelhecimento afeta as células e os sistemas formados por elas, bem como componentes histológicos como o colágeno, por exemplo. Durante os períodos de crescimento, os processos anabólicos excedem as mudanças catabólicas. Uma vez que o organismo alcance a maturidade fisiológica, a taxa de mudança catabólica ou degenerativa se torna maior que a taxa de regeneração celular anabólica.<sup>24</sup>

Dentro deste contexto, o envelhecimento é marcado por uma perda progressiva de massa corpórea magra, assim como mudanças na maioria dos sistemas orgânicos. Entretanto, ainda é uma questão em debate, pois não sabemos se algumas destas mudanças são o resultado inevitável dos eventos programados geneticamente ou de influências ambientais prolongadas.<sup>29</sup>

A partir do fenômeno do envelhecimento populacional, a compreensão do fenômeno biológico do envelhecimento passou a ser um tema importante nas pesquisas contemporâneas.

A partir dos estudos conduzidos hoje, já pode ser feita uma síntese do que acontece com o passar dos anos na biologia dos organismos complexos, onde o ser humano está incluído. A seguir comentaremos algumas questões relacionadas com estas mudanças.

Mais do que nunca, o interesse é crescente em identificar os fatores que levam ao envelhecimento bem sucedido, pois as discussões sobre a extensão de vida são freqüentemente estendidas à idéia de que envelhecer não significa necessariamente adoecer, ou seja, o foco central gira em torno do interesse dos idosos, da velhice e do envelhecimento com uma boa saúde. Pode-se dizer que o envelhecimento não é necessariamente um fator determinante no aparecimento destas doenças.

Esta aparente obviedade é crucial para a gerontologia e para a geriatria. Isto porque, para estabelecermos o que é um estado patológico associado ao envelhecimento, e o que são modificações esperadas neste momento das nossas vidas, foram necessários estudos intrincados envolvendo modelos experimentais e investigações populacionais que literalmente acompanharam o envelhecimento das pessoas.

Com o surgimento do campo da Gerontologia, ao longo do século XX, iniciou-se um entendimento das questões da velhice e do envelhecimento e as mudanças típicas deste processo e seus determinantes genético-biológicos, psicológicos e sócio-culturais. Esta área tem como característica fundamental a interdisciplinaridade, uma vez que a abordagem do problema exige uma análise global e multifacetada, calcada na associação de diferentes áreas do conhecimento biológico como: fisiologia, morfologia, química, genética, bioquímica, etc..., onde suas pesquisas acabam sendo englobadas num referencial teórico científico

centralizador: a gerontologia biomédica, ainda emergente no País e responsável por agrupar os mais variados segmentos de estudos e linhas de pesquisa propostos que investiguem e implementem estratégias voltadas ao atendimento dos grupos com mais idade. Portanto, a biogerontologia ainda carece de apoio e intercâmbio de evidências experimentais a fim de que estas subsidiem de modo mais consistente tais teorias.<sup>30, 31</sup>

Talvez seja esta heterogeneidade, tanto do envelhecimento intrínseco (pessoal) quanto do envelhecimento de um determinado grupo étnico, que torna tão árdua a tarefa de estabelecermos o que é normal do que é patológico. E o que é mais problemático, tornam uma atividade altamente complexa, a determinação do que é uma variável de risco de desenvolver uma doença para todas as pessoas, em todas as idades, e o que é uma variável de risco para subgrupos populacionais específicos, considerando principalmente grupo etário, etnia e gênero.

Entretanto, o processo de envelhecimento brasileiro está longe de ser tranqüilo e ter o mesmo padrão observado em países desenvolvidos. Isso porque a transição demográfica do perfil de saúde denominada de transição epidemiológica fez aumentar um grupo de doenças associadas às alterações decorrentes do envelhecimento, as doenças não-transmissíveis ou crônico-degenerativas, dentro das quais, podem-se citar a aterosclerose, a hipertensão, o diabetes, a obesidade, a osteoporose, as neoplasias e as cardiovasculares entre outras, ao mesmo tempo que as doenças infecto-contagiosas continuam assolando grande parte da população brasileira.<sup>32, 33</sup>

Tal fenômeno foi descrito por Chaimowicz<sup>16</sup> como “fenômeno da polarização epidemiológica”, ou seja, a população brasileira tornou-se mais velha

demograficamente, mas as doenças características de países jovens e subdesenvolvidos ainda continuam presentes em algumas regiões do país.

Como já foi anteriormente salientado, um dos principais fatores ambientais capazes de influenciar significativamente a expectativa de vida, diz respeito à qualidade da alimentação. Neste caso, um grande número de evidências tem sido acumulado sugerindo que, mais especificamente, a restrição da dieta agiria sobre o processo de envelhecimento e, por conseguinte, na longevidade.<sup>34, 35</sup>

Este fato já foi bem evidenciado em animais experimentais que, nestas condições, apresentam acúmulo de modificações associadas ao envelhecimento, disfunções e doenças. É um campo interdisciplinar que abre expectativas para a compreensão do processo do envelhecimento em relação a gênese, hábitos alimentares e estilo de vida, buscando o desenvolvimento de ações preventivas e terapêuticas associadas.

Entretanto, qual seria o papel dos compostos bioativos no metabolismo orgânico? Responder esta questão passa pelo entendimento da ação de alguns compostos químicos como os radicais livres e os agentes anti-oxidantes

### **2.3 ESPÉCIES ATIVAS DE OXIGÊNIO, DANO OXIDATIVO, ENVELHECIMENTO E DOENÇAS**

A vida não poderia existir sem a presença do oxigênio, que é a base para a evolução de organismos que incluem desde muitos procariotos primitivos até plantas e animais neste planeta. Sem ele não poderíamos aproveitar a energia da nossa alimentação e, sem energia, o corpo, principalmente de espécies complexas (multicelulares), não poderia sobreviver. Além do papel fundamental para a vida dos

organismos, o oxigênio atua em espécies mais complexas, como é o caso do ser humano, em funções metabólicas específicas.<sup>36</sup> Devido ao fato do oxigênio ser quimicamente um elemento muito reativo, o mesmo pode ser altamente perigoso se não for regulado, produzindo muitas moléculas oxidadas dentro do corpo e provocando a destruição de células e tecidos. Durante todas as reações bioquímicas normais, o oxigênio reage prontamente para oxidar outras moléculas que estão na sua vizinhança. Se não há mecanismo de controle para isto, uma reação em cadeia pode ocorrer, onde as moléculas oxidadas chamadas de radicais livres, se tornam instáveis. Para regular o poderoso efeito oxidante dos radicais livres, o organismo conta com duas fontes de compostos (endógenos e exógenos) que reagem com tais moléculas, e são denominadas de substâncias antioxidantes. Na forma endógena tais substâncias são conhecidas como enzimas anti-oxidantes, como é o caso da superóxido dismutase, da catalase e da glutathione-peroxidase. As fontes exógenas incluem compostos nutritivos ou não-nutritivos como é o caso de vitaminas e compostos bioativos como os flavonóides.<sup>37, 38</sup>

Em 1915, Paul Ehrlich, biólogo alemão, constatou que os animais precisavam do oxigênio para viver, aprofundando evidências sobre a relação dos aspectos bioquímicos da utilização do oxigênio, especialmente pelos seres humanos. Recentemente, após longos estudos, as evidências sobre os metabólitos do oxigênio começaram a ser esclarecidas de forma específica. A natureza do processo do envelhecimento tem sido alvo de vários estudos e dentro das teorias usadas para explicar tal fenômeno, a Teoria dos Radicais Livres tem sido a mais aceita até o presente momento.<sup>39</sup>

Por volta da década de 1960, uma grande quantidade de estudos demonstrou claramente que os radicais livres são também formados durante o metabolismo

normal. Como conseqüência, passou a ser bastante difundido o conceito de que a possibilidade de dano oxidativo à biomoléculas é inerente ao uso de oxigênio pelos organismos aeróbicos.

Estudos envolvendo evidências científicas em torno do estresse ou dano oxidativo comprovam uma forte associação com o envelhecimento, embora não de forma causal. O provável mecanismo de associação seria através da produção de espécies ativas de oxigênio (EAOS), ou simplesmente radicais livres. Os radicais livres são formados na mitocôndria. A longevidade seria inversamente proporcional à extensão do dano oxidativo e diretamente proporcional à atividade das defesas antioxidantes. A Teoria do Dano Oxidativo postula que todas ou a maioria das deficiências fisiológicas características de mudanças realmente relacionadas com a idade podem ser atribuídas aos danos intracelulares produzidos pelos radicais livres. Sabe-se que diversas biomoléculas diferentes são atacadas por radicais livres. A peroxidação lipídica e o dano ao DNA são provavelmente os exemplos mais importantes de tais danos. O dano “em rede” produzido seria o resultado de diversas variáveis complexas como o tipo de radical presente, sua taxa de produção, a integridade estrutural das células e a atividade dos diferentes sistemas de defesa antioxidante presentes no organismo.<sup>40</sup>

A presença de radicais livres em materiais biológicos foi identificada, há cerca de 50 anos, por Harman, que lançou sua teoria do envolvimento dos radicais livres no processo de mutagênese, câncer e envelhecimento. Este conceito, apesar de coerente, não pode ser claramente provado ou negado por um único experimento, portanto, diversos estudos e evidências têm sido levantadas para testar e provar este fato.<sup>41</sup>

Conceitualmente, radicais livres são definidos como um átomo, grupo de átomos ou molécula com um elétron desemparelhado ocupando o orbital mais externo, o que os torna extremamente reativos. Esta definição inclui íons de metais de transição, o átomo de hidrogênio, o óxido nítrico e o dióxido de nitrogênio. Os radicais livres são, por convenção, representados  $X^{\bullet}$ .<sup>42</sup>

Cada átomo de radical livre possui orbitais, regiões com elétrons em torno do núcleo, podendo conter apenas dois elétrons, os quais realizam rotações em direções opostas em torno do próprio eixo, para manter a estabilidade. Sendo assim, um elétron que gira para a esquerda pode ser equilibrado por outro que se desloca para a direita, denominando-se *spins* opostos num mesmo orbital. Um composto transforma-se em radical livre de três formas básicas: (1) ganhando um elétron; (2) perdendo um elétron ou (3) sofrendo fissão homolítica de ligação covalente.<sup>43</sup>

No organismo, os radicais livres são reconhecidos como substâncias tóxicas sendo altamente reativos e instáveis, capazes de grandes alterações químicas em um espaço de tempo curto. A toxicidade do oxigênio não se deve apenas aos radicais livres dele derivados, mas também a outros estados do oxigênio, como o peróxido de hidrogênio e o oxigênio *singlet*, que são denominados em conjunto espécies ativas de oxigênio (EAOs). O oxigênio, por aceitar facilmente elétrons de outras moléculas, caracteriza-se como um agente oxidante em potencial. Entretanto, são indispensáveis para determinados processos fisiológicos no organismo.<sup>44</sup>

Em células vivas o oxigênio pode seguir duas rotas distintas:<sup>45</sup> 1) a oxidase, que consiste na formação de água após receber quatro elétrons na cadeia respiratória acoplada à fosforilação oxidativa (formação de ATP); 2) a oxigenase, que consiste na formação dos EAOs pelo oxigênio, recebendo um elétron de cada vez.

Assim, conforme o local e a quantidade, resultarão diferentes tipos de alterações químicas que provocam a destruição de determinadas estruturas celulares e de funções de células, promovendo o envelhecimento e diversas patologias. O dano celular causado pelos radicais livres acontece quando há reação inespecífica com todos os componentes celulares. Atacam virtualmente todas as biomoléculas de membranas citoplasmáticas e de organelas, a estrutura do DNA, podendo gerar mutações. A ação dielétrica dos radicais livres é controlada pelo sistema de defesa do organismo, pelos agentes antioxidantes, impedindo o estresse oxidativo e, conseqüentemente, o dano tecidual. Quando os radicais livres ocorrem em excesso isto pode levar a um dano celular, porque ácidos graxos importantes e proteínas da membrana celular se tornam instáveis, e seu “traffic-directing” (efeito de balanceamento do fluxo de entrada e saída da célula) se torna ineficaz. Quando a membrana celular é oxidada, também se torna endurecida e, com isso, os nutrientes não podem entrar na célula ou pode haver ruptura na parede celular e esta célula entrará em colapso, pois o fluído celular será drenado.<sup>46</sup>

Evidências científicas demonstram que o estresse oxidativo se encontra, comumente, por trás do processo de envelhecimento e das doenças associadas com ele. Está freqüentemente associado com alterações nas concentrações séricas de glicose e lipídios. Anos de pesquisas têm mostrado que os radicais livres são a maior causa dos danos celulares nas diversas doenças degenerativas do nosso tempo.

Para uma maior compreensão de como isto ocorre, temos que buscar o entendimento dos efeitos específicos dos EAOs sobre biomoléculas e outros componentes, e da reação dos mecanismos de defesa e reparo frente as EAOs e ao estresse oxidativo, que correspondem aos seguintes processos:<sup>47</sup>

- **peroxidação de lipídios:** processo fisiológico contínuo que ocorre principalmente nas membranas celulares. É uma etapa essencial para a biossíntese de prostaglandinas e leucotrienos, bem como na fagocitose, pinocitose e desmonte de membranas celulares. A peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados consiste no enfraquecimento das ligações duplas de cadeia de carbono, reação com o oxigênio, formação de um radical peróxido (R-OO) e subtração do hidrogênio de outra molécula lipídica, formando uma reação em cadeia. Torna-se um processo irreversível a partir do momento que as células não conseguem estabelecer reparos cumulativos que possam reverter ou utilizar os produtos finais da peroxidação lipídica e, com isso, desencadeariam o processo de senescência celular. Este processo leva a danos nas membranas celulares que são formadas por uma bicamada lipídica;<sup>48</sup>

- **oxidação e glicosilação de proteínas e enzimas:** caracteriza-se pela oxidação dos grupos. As mudanças estruturais subseqüentes reduzem ou eliminam a atividade enzimática. A formação de ligações cruzadas ou desnaturação de proteínas também apresenta efeitos em cascata, como no caso dos lipídios. Ocorre a inativação de enzimas inibidoras de proteases como a  $\alpha$ -antitripsina, desencadeando, com isso, a ação da enzima proteolítica chamada colagenase que amplifica o dano aos tecidos;<sup>49</sup>

- **dano ao DNA:** o DNA sofre lesões oriundas dos ataques sofridos pelas EAOs promovendo, com isso, a ocorrência de reparos incorretos ao dano ocorrido (mutações). A principal destruição ocorre pela ligação de bases pirimídicas na ligação com a desoxirribose, ocorrendo rompimento da ligação glicose-fosfato liberando, assim, os nucleotídeos na sua forma livre.<sup>50, 51</sup>

- **ação sobre os glicídios:** promovem a despolimerização de polissacarídeos, especialmente o radical superóxido. Os subprodutos da oxidação glicídica poderá ser incorporado à estrutura das proteínas, constituindo uma glicosilação protéica, comprometendo a estrutura e função, principalmente das proteínas de longa vida, como as presentes nas células nervosas.

- **interrupção do fluxo iônico e ruptura de passos metabólicos:** quando ocorre a captura de elétrons pelas EAOs, promovendo a oxidação de NADPH para NADP, muitas reações de manutenção celular acabam não acontecendo, tais como defesa antioxidante e processos de biossíntese, como a lipogênese.<sup>52</sup>

- **doenças humanas associadas às EAOs:** estudos relatam que, de forma isolada ou conjunta, o estresse oxidativo e o acúmulo de danos em moléculas essenciais predis põem o organismo a doenças, principalmente as crônico-degenerativas, que se processam de forma lenta e progressiva no organismo. Devido a isso, elas estão intimamente associadas ao processo do envelhecimento e sua etiologia parece estar fortemente centrada na homeostasia e no metabolismo celular, como é o caso das neoplasias e das doenças cardiovasculares.

Os principais radicais livres conhecidos são o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), radical muito reativo, devido a isso, deve ser removido dos tecidos; radical hidroxila ( $OH^-$ ), sendo o radical livre mais instável e reativo, não havendo enzimas para a catalização; radical peroxil ( $ROO^-$ ) e alcoxil ( $RO$ ), menos reativos e mais seletivos. Entretanto, existem outras substâncias que não são consideradas por alguns autores como radicais livres, mas se enquadram no mesmo estudo pela sua ação como: água oxigenada ( $H_2O_2$ ), ânion hipoclorito ( $OC$ ) e oxigênio *singlet* ( $O^*$ ).<sup>43, 53</sup>

Como anteriormente comentado, a ação dos radicais livres, entretanto, é interceptada pela ação de agentes antioxidantes enzimáticos, antioxidantes

provenientes da dieta, ou quando dois radicais livres encontram-se pelo mecanismo de oxi-redução, sendo que um radical sofrerá oxidação doando um elétron a outro radical que, por conseguinte, estará sofrendo um processo de redução, estabilizando o átomo.<sup>54</sup>

## **2.4 MECANISMOS DE DEFESA ANTIOXIDANTES E REPARO DO ESTRESSE OXIDATIVO**

Os organismos multicelulares sofrem alterações fisiológicas progressivas e irreversíveis que caracterizam a senescência, contudo, as bases moleculares e fisiológicas desses mecanismos e as causas que levam a essas modificações ainda não foram bem esclarecidas. Um dos mecanismos envolvidos no processo do envelhecimento seria a produção de radicais livres ou outros agentes oxidantes, freqüentemente denominados espécies ativas de oxigênio, produzidos durante a respiração aeróbica. Estes causam graves danos moleculares, que podem resultar em mutações e, posteriormente, na formação de células tumorais, pois determinam alteração no equilíbrio interno (homeostase) dos organismos que ocasiona, entre outras anomalias, disfunções metabólicas. Os outros mecanismos postulados incluem: danos cumulativos ao DNA, levando à instabilidade gênica; alterações epigênicas que levam a mudanças no padrão de expressão gênica com o encurtamento do telômero em células replicativas e a glicosilação não enzimática de proteínas de longa duração.

Entretanto, as espécies reativas de oxigênio possuem um papel importante na patologia de muitas doenças podendo proteger as células contra o dano oxidativo. Para minimizar os efeitos tóxicos dos radicais livres formados é necessário um adequado equilíbrio entre as substâncias pro-oxidantes e as antioxidantes, em

especial as atividades enzimáticas. Assim, tem-se observado que os animais possuem formas especialmente eficientes de superóxido dismutase (SOD) e outras enzimas antioxidantes e destoxicantes.<sup>55</sup>

Conceitualmente, os antioxidantes são moléculas de carga positiva que se combinam com os radicais livres de carga negativa, tornando-os inofensivos, ou seja, essas substâncias teriam a capacidade de anular a ação de oxidação desses radicais. São substâncias que retardam ou previnem danos, deterioração ou destruição causados pela oxidação de biomoléculas e membranas pelas EAOs. Protegem organismos aeróbicos do estresse oxidativo, definido como elevação na formação de espécies reativas de oxigênio.

Quanto aos mecanismos de defesa antioxidante, temos os de forma **exógena** e **endógena**.

- **exógenas:** evidências recentes têm demonstrado que dietas com elevado conteúdo de vegetais, frutas e grãos podem reduzir o risco de inúmeras doenças, pois são ricos em substâncias antioxidantes presentes nos compostos bioativos de alguns alimentos, relacionadas à freqüente associação entre danos teciduais e liberação de radicais livres. Entre os antioxidantes exógenos, obtidos por meio da alimentação, estão as vitaminas C, E e  $\beta$ -caroteno; os compostos bioativos presentes em frutas e vegetais e alguns minerais como zinco, cobre, manganês e selênio que são necessários na composição de algumas enzimas antioxidantes endógenas.<sup>56</sup>

- **endógenos:** temos moléculas como as coenzimas doadoras de hidrogênio e enzimas como a superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e a catalase (CAT), que são fundamentais para a homeostasia celular.<sup>57</sup>

Evidências científicas mostram que enzimas sofrem declínio ao longo do processo do envelhecimento comprometendo o equilíbrio entre a produção de EAOs e as defesas antioxidantes, com isso levando a um maior dano oxidativo. No sistema oxidante onde ocorrem deficiências, os tecidos perdem a proteção aos efeitos dos radicais livres e vários estudos sugerem a participação dos mesmos no desenvolvimento de várias doenças como: doenças oncológicas, cardíacas, artrite reumatóide, diabetes e, mesmo o próprio processo do envelhecimento.<sup>58</sup>

Os sistemas de defesa antioxidantes constituídos por substâncias antioxidantes altamente específicas inativam as espécies reativas de oxigênio e reparam danos que possam interferir nas células. São estas substâncias que, quando presentes em baixas concentrações, em comparação com as de um substrato oxidável, retardam ou impedem significativamente a oxidação daquele substrato. Portanto, o termo substrato oxidável, inclui quase tudo encontrado nas células vivas, inclusive proteínas, lipídeos e carboidratos.<sup>59</sup>

Afortunadamente, o corpo possui compostos antioxidantes para limitar o dano. Toda uma família de enzimas antioxidantes é providenciada no tecido saudável, junto com substâncias como a cisteína e a glutatona. Constituintes do sangue como o ferro, que contém a transferrina, também agem para prevenir a produção de moléculas oxidadas prejudiciais. Os antioxidantes naturais encontrados nas plantas, que fazem parte da dieta alimentar, são conhecidos por prevenir danos oxidativos induzidos por radicais livres sendo, também, de grande importância na prevenção de doenças.<sup>60, 61, 62</sup>

Os principais antioxidantes intracelulares do corpo humano são as enzimas SOD, CAT, e GPX. Existem duas isoenzimas da SOD nas células humanas: uma

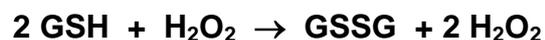
presente no citosol contendo íons cobre e zinco; e outra mitocondrial, contendo íons magnésio. Ambas catalisam a mesma reação.<sup>63, 64</sup>

O esquema abaixo representa a ação das enzimas antioxidantes endógenas:



Sendo assim, torna-se importante enfatizar que as isoenzimas são moléculas que catalisam a mesma reação, porém, apresentam estruturas diferentes uma vez que são sintetizadas a partir de genes diferentes. Esta tem como produto a água oxigenada, que deve ser retirada do meio o mais rapidamente possível, por tratar-se de espécie de oxigênio reativo, podendo originar outros radicais. Por isso, a atuação da SOD deve ocorrer juntamente com as enzimas que catalisam a remoção da água oxigenada: catalase e glutathione peroxidase.<sup>65</sup>

O estudo dos erros inatos do metabolismo sugere que a glutathione peroxidase é a enzima mais importante na remoção da água oxigenada dos tecidos humanos, provavelmente porque está localizada no mesmo compartimento subcelular que a SOD (a maioria no citosol e algumas em mitocôndrias). A glutathione peroxidase é a única enzima humana conhecida que requer o elemento selênio para a sua atividade: um resíduo de selênio e cisteína (cadeia lateral –SeH ao invés de –SH como uma cisteína normal) está presente no sítio ativo da enzima. A glutathione peroxidase remove a água oxigenada, utilizando-a para oxidar o glutathione reduzido (GSH) em glutathione oxidada.<sup>66</sup> O esquema abaixo representa a reação da GPX, onde temos como produto moléculas de GSSG e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:



Além destes sistemas descritos, as membranas celulares possuem como antioxidante de quebra da cadeia o alfa-tocoferol, uma molécula lipossolúvel que está localizada no interior das membranas biológicas. Este é o mais importante antioxidante de quebra de cadeia presente nas membranas humanas, embora não seja o único. Há um grupo –OH ligado à estrutura hidrofóbica do alfa-tocoferol cujo átomo de hidrogênio é facilmente removível. Assim, quando os radicais peroxi e alcoxi são gerados durante a peroxidação de lipídeos, eles se combinam preferencialmente com o antioxidante, ao invés de se combinar com um ácido graxo adjacente. A reação em cadeia demonstra o produto resultante, por isso o nome antioxidante de quebra de cadeia,  $LOO + \text{tocoferol-OH} \rightarrow LOOH + \text{tocoferol-O}$ .<sup>67</sup>

O estresse oxidativo fundamenta-se no consumo de oxigênio que acontece quando há formação significativa de radicais livres, sendo necessárias mais moléculas de oxigênio para formar os ânions superóxido, o ácido hipocloroso. Assim o consumo de oxigênio pela célula aumenta, ou também diminui nas defesas antioxidantes; o que dá margem a uma maior formação de espécies reativas de oxigênio nos tecidos. Portanto, salienta-se que o estresse oxidativo sempre ocorre quando há formação de radicais livres oxigenados, seja em condições patológicas ou fisiológicas.<sup>68</sup>

Sendo assim, em condições normais existe um equilíbrio entre a formação de radicais livres e sua neutralização por sistemas de defesa antioxidantes, de forma que as moléculas e células lesadas são reparadas ou encaminhadas para outro sistema de reparo dos danos celulares por EAOs, que é o processo de apoptose celular. Este processo é altamente regulado e extremamente relevante para a remoção de células desnecessárias, danificadas, infectadas ou potencialmente neoplásicas. Assim, estas células que foram danificadas pelo dano oxidativo e que

poderiam se tornar carcinogênicas seriam eliminadas através da apoptose. Entretanto, se houver um desequilíbrio nesse mecanismo de apoptose e ocorrer a exposição a um estresse oxidativo acentuado, poderia ser desencadeado um processo de apoptose exagerado levando com isso ao aparecimento de algumas doenças crônico-degenerativas, tais como Alzheimer e Parkinson.<sup>69</sup>

A modificação de determinadas moléculas pela ação dos radicais livres gera, ao longo do tempo, uma alteração no funcionamento celular e possibilita o envelhecimento. Essas alterações motivam cada vez mais estudos mostrando que o número de substâncias antioxidantes constitui um tema de investigação de interesse crescente. Entretanto, o conhecimento profundo dos mecanismos de ação destas substâncias pode permitir a utilização terapêutica com a finalidade de diminuir ou, ao menos, retardar os efeitos maléficos dos radicais livres.

Estudos biogerontológicos têm como perspectiva elucidar estas questões, principalmente no que se refere ao envelhecimento e patologias mais comumente associadas a velhice, buscando assim subsídios para a compreensão dos mecanismos envolvidos nesse processo que possam ser aplicáveis na prevenção primária como um todo.

## **2.5 ALIMENTO FUNCIONAL**

Desde épocas antigas, por volta de 430 a.C., o princípio, exposto por Hipócrates, *“Permita que o alimento seja teu medicamento e que o medicamento seja teu alimento”*, tem norteado os estudos da comunidade científica, principalmente de profissionais da saúde envolvidos na prevenção e tratamento de doenças.<sup>70</sup>

Nos últimos anos, o termo funcional aplicado aos alimentos tem adotado uma conotação diferente que é a de proporcionar um benefício fisiológico adicional, além de satisfazer as necessidades nutricionais básicas, sendo ainda mais significativo o potencial dos alimentos funcionais de prevenção a doenças, promoção de saúde e conseqüente redução dos custos de assistência à saúde. Os alimentos passaram a ser vistos como sinônimos de bem-estar, redução de riscos a doenças e veículos de uma melhor qualidade de vida.<sup>71</sup>

Diversos fatos vêm motivando ou justificando esse interesse como: o reconhecimento da relação saúde-nutrição-doença, pesquisas clínicas e levantamentos epidemiológicos, evolução de conceitos relativos às recomendações nutricionais, fenômenos socioeconômicos e novas perspectivas industriais.

Em particular, tem havido uma explosão do interesse dos consumidores no papel dos alimentos específicos ou componentes alimentares ativos fisiologicamente, denominados atualmente de alimentos funcionais.

Pesquisas bioquímicas e clínicas vêm mostrando a presença em alimentos, de componentes químicos que podem ter ação biológica importante na manutenção da saúde, além dos nutrientes conhecidos de acordo com as necessidades diárias já estabelecidas.<sup>72</sup>

Em contrapartida, houve mudança nos conceitos referentes às necessidades e recomendações nutricionais. A partir da idéia de nutrientes servirem para prevenirem ou combaterem “deficiências nutricionais”, passou-se a ter nutrientes e outros componentes bioativos para “promoção de saúde”.<sup>73</sup>

O aumento da expectativa de vida em quase todo mundo promoveu um aumento do crescimento nas alíquotas financeiras referentes à saúde, pela

incidência de doenças crônico-degenerativas e a necessidade de manter-se a qualidade de vida satisfatória em pessoas idosas.<sup>74, 75, 76</sup>

A obesidade é considerada atualmente como uma doença de múltiplas etiologias, conseqüências e tratamentos. O conceito clássico de obesidade é o acúmulo excessivo de tecido adiposo no organismo, que, na população em geral, ocorre devido principalmente a mudança nos hábitos de vida produzida pelo avanço tecnológico destas últimas décadas.<sup>77, 78, 79</sup>

Um dos fatores que promovem o aparecimento de doenças crônico-degenerativas como as cardiovasculares, câncer, hipertensão, diabetes, obesidade entre outras, no mundo atual é resultante do avanço da industrialização em países desenvolvidos podendo ser mostrado pelas tendências desfavoráveis do excessivo consumo de gorduras, sal, açúcar e ainda, diminuição considerável no consumo de legumes, fibras dietéticas, frutas e vegetais. Os compostos bioativos entram com a proposta de melhorar os mecanismos de defesa biológica, prevenir doenças específicas, controlar condições físicas e mentais e retardar o processo de envelhecimento.<sup>80</sup>

Esses fatos motivaram, no Japão a regulamentação de todo o potencial da alimentação e dos conhecimentos milenares da cultura oriental na busca da prevenção dessas doenças.

Assim, o termo *alimento funcional* foi introduzido no Japão por volta de 1980 e pode ser definido como “todo alimento ou parte de um alimento que proporcione benefícios à saúde, prevenindo e controlando doenças” além de satisfazer os requerimentos nutricionais tradicionais. O Japão foi o primeiro país que formulou um processo de regulação específico para os alimentos funcionais. Conhecidos como alimentos para *Uso Específico de Saúde (FOSHU)*, estes alimentos são qualificados

e trazem um selo de aprovação do Ministério e Previdência Social Japonesa. Assim, os alimentos funcionais atuam no organismo através dos seus compostos bioativos que proporcionam benefícios potenciais à saúde, podendo auxiliar na redução de doenças crônico-degenerativas.<sup>75, 83</sup>

No Continente Europeu, iniciou-se em 1996 a chamada COST (Cooperação em Ciência e Tecnologia) que teve como principal objetivo na chamada “Ação 916” o início das pesquisas sobre componentes bioativos em alimentos vegetais combinando esforços de países europeus no estudo da ocorrência, alterações induzidas pelo processo e os efeitos fisiológicos dos componentes bioativos de nossas dietas, perfazendo um total de 16 países participantes ativamente nesta ação. A partir daí, foram formados grupos de especialistas (dois de cada país) que a cada seis meses voltam a discutir o tema apresentando o nível de desenvolvimento das pesquisas. Os grupos de trabalho desenvolvem estudos abordando os seguintes temas e divulgando as informações para o mundo todo:

- análise e metodologia;
- interações com o trato intestinal e biomarcadores da ingestão e efeito;
- interações moleculares e genéticas envolvendo compostos bioativos;
- tecnologia e disseminação do produto.

Na União Européia, embora as alegações de propriedades funcionais estejam proibidas, existe um projeto extensivo de revisão das leis relacionadas aos alimentos como um todo. Concomitantemente, para cada país da comunidade, tais como a Bélgica, Holanda, Reino Unido e Suécia, foram elaboradas normas próprias baseadas em consensos entre os cientistas para estabelecer informações comprovadas através das pesquisas.<sup>81, 82</sup>

Frente a isso, no ano de 1999, como anteriormente comentado, através da Portaria nº 398 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde do Brasil, foi proposta como definição adequada para alimentos funcionais: “Qualquer alimento ou parte do alimento que proporcione efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou benéficos à saúde, devendo ser seguro para o consumo a partir das pesquisas, incluindo a prevenção e o controle de doenças, além de satisfazer os requerimentos nutricionais tradicionais”.

A regulamentação da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) fornece regulamento técnico-científico estabelecendo as diretrizes básicas para a análise e comprovação de propriedades funcionais criando duas resoluções:

- Alegação de propriedade funcional: é aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico de uma substância (seja nutriente ou não) tendo efeito no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais ao organismo humano;

- Alegação de propriedade de saúde: é aquela que afirma, sugere ou implica a existência de relação entre o alimento ou ingrediente com a doença ou condição relacionada à saúde, porém, não são permitidas alegações de saúde que façam referência à cura ou prevenção de doenças.

### **2.5.1 Requisitos para que um alimento seja considerado funcional**

Denominação do produto, finalidade de uso, recomendação de consumo, descrição científica dos ingredientes, do produto segundo espécie de origem botânica, animal ou mineral, composição química, descrição da metodologia

analítica para avaliação dos componentes, evidências científicas em relação ao seu benefício à saúde e a comprovação de segurança.

### **2.5.2 Etapas necessárias em pesquisas buscando evidências científicas para comprovação da alegação de propriedade funcional ou de saúde**

Ensaio nutricionais e / ou fisiológicos e/ ou toxicológicos em **animais de experimentação**, ensaios bioquímicos, estudos epidemiológicos, ensaios clínicos, comprovação de uso tradicional observado na população sem danos à saúde, evidências abrangentes da literatura científica, órgãos internacionais de saúde e legislação internacionalmente reconhecida sobre as propriedades e características do produto.

Segundo o FDA (*Food and Drug Administration*) os alimentos funcionais conferem ao indivíduo um impacto na saúde e bem-estar sendo vistos como promotores de saúde e podem estar associados à redução ao risco a certas doenças. Entretanto, alimentos funcionais sozinhos não podem garantir boa saúde, eles podem melhorar a saúde quando parte de uma dieta contendo uma variedade de alimentos.

O *Committee of Diet and Health*, divulgou no final dos anos 90 uma recomendação para que a população aumente o consumo de grãos, frutas e vegetais, pois caso contrário, as doenças crônico-degenerativas irão crescer e os países não terão recursos para manter a saúde da população, especialmente aquela acima dos 60 anos.

Atualmente a agricultura se empenha em manter os sistemas alimentares que compreendem os aspectos de produção, distribuição e consumo dos alimentos.

Entretanto, embora alimentos funcionais e orgânicos sejam igualmente de qualidade reconhecidamente superior, é importante esclarecer que as propriedades funcionais de um alimento nada tem a ver com o seu sistema de produção. Logicamente, haverá diferença na qualidade biológica e nutricional da concentração de compostos bioativos se produzidos em condições desfavoráveis de solo e clima.<sup>83</sup>

A partir dos estudos científicos, podemos observar que muitas pesquisas nesta área estão sendo implementadas visando desvendar os mistérios acerca do processo de envelhecimento. Entre estas, temos o uso de intervenções farmacológicas, como o uso de antioxidantes, por exemplo, altas doses de vitamina E, vitamina C, uso de hormônios como a melatonina, estrogênio, hormônio do crescimento, terapêuticas especializadas, restrição calórica, entre outras. Porém, a despeito dos estudos realizados, estes procedimentos ainda são controversos e, portanto, requerem cautela.<sup>84</sup>

Segundo a Associação Brasileira de Cardiologia, que reconhece cientificamente o papel de compostos bioativos do grupo dos flavonóides como potenciais antioxidantes naturais, pode-se definir os mesmos como sendo compostos não nutritivos com potente atividade antioxidante, atribuída aos radicais fenólicos. São encontrados em diversos alimentos de origem vegetal como maçã, uva, cebola, repolho, brócolis, chicória, aipo, chá e vinho tinto. Como exemplo, temos o azeite de oliva (óleo vegetal extraído da prensagem do fruto da oliveira, a azeitona), que traz inúmeros benefícios à saúde por ser fonte de gordura monoinsaturada, relacionada à redução do LDL, conhecido como mau colesterol, sem reduzir as taxas de HDL, o bom colesterol.

Relatos demonstram os efeitos não tóxicos de flavonóides e sua ação na redução da vulnerabilidade do endotélio microvascular à inflamação e estresse

oxidativo. As antocianinas podem atuar como antioxidantes em espécies reativas de oxigênio (EAOs) geradas por neutrófilos e monócitos, resistindo aos efeitos tóxicos gerados por essas espécies. Um possível processo com as EAOs pode explicar os efeitos deletérios que são ativados por monócitos e neutrófilos. Os mecanismos moleculares envolvidos no recrutamento via ações de diferentes quimioatraentes secretados por células endoteliais parecem depender de complexos processos.<sup>85</sup>

Algumas substâncias podem ser de natureza não nutritiva, como é o caso da classe dos pigmentos entre outros. Entretanto, a existência de grande variedade de substâncias potencialmente quimioproláticas ou de uma substância química biologicamente ativa faz com que este grupo de alimentos tenha destaque na prevenção contra doenças crônico-degenerativas.<sup>86</sup>

### **2.5.3. Componentes Bioativos**

Componentes bioativos podem ser oriundos de fontes vegetais ou animais, apresentando diferentes efeitos em nosso organismo e/ou ocorrendo sob diferentes formas de apresentação. São conhecidos por suas propriedades antioxidantes associadas com os efeitos de promoção de saúde, onde os estudos são recentes não existindo recomendações oficiais de quanto deve ser consumido para se obter os efeitos benéficos em relação as doenças cardíacas, infartos e alguns tipos de câncer. É importante ressaltar que a proteção à saúde é, sem sombra de dúvida, o produto de ações coletivas que se somam oriundas de substâncias naturais encontradas em uma dieta equilibrada.<sup>87</sup>

Sendo assim, segue abaixo os diferentes grupos de substâncias de acordo com a sua origem:

### 2.5.3.1 VEGETAL

**FITOQUÍMICOS:** são compostos bioativos de plantas presentes em frutas, vegetais e alguns grãos. Apresentam papel fundamental na bioquímica do nosso organismo, estando intimamente relacionados aos antioxidantes. O reconhecimento de que muitos destes compostos possuem propriedades que permitem modular e interagir com sistemas biológicos, aponta para a reavaliação do seu papel na nutrição humana.

**a) POLIFENÓIS:** são compostos encontrados em quase todos os alimentos vegetais e são uma das principais fontes de compostos bioativos da dieta. Mais de 8000 polifenóis são conhecidos e mais de 2000 são encontrados na natureza. Nas plantas, eles são essenciais para a pigmentação, crescimento, reprodução, resistência a patógenos e para muitas outras funções. Dentre o grupo dos polifenóis encontramos vários sub-grupos como **flavonóides, fitosteróis, fitoestrógenos, fitato** e outros. Todos com funções benéficas para a saúde.

**a.1) FLAVONÓIDES:** Estão entre os mais importantes polifenóis e subdividem-se em **flavonas/flavanonas, antocianinas e catequinas/flavonóides e fitoestrógenos**. Os Flavonóides estão normalmente ligados a vários açúcares em complexos chamados glicosídeos. Podem reduzir a incidência de doenças cardiovasculares, câncer e o mau colesterol (LDL); estimulam enzimas protetoras, têm agentes antiúlcera e previnem o câncer. Encontramos flavonóides nas cebolas, chá preto, *maçã*, uvas entre outros. São encontrados principalmente nas camadas externas das plantas e vegetais. Quando ligados aos açúcares, tendem a ser estáveis durante a cocção dos alimentos. Contudo, significantes perdas físicas ocorrem se a camada externa de frutas, tais como maçãs e pêras são removidos

antes do consumo ou durante o processo industrial. A remoção da casca antes de comer a maçã, reduz o consumo de flavonóides a praticamente zero. Esta é a razão pela qual o conteúdo de polifenóis no vinho tinto é muito menor do que nas uvas, das quais é produzido.<sup>88</sup>

- **Flavonas/flavononas:** são encontradas na maioria das frutas e hortaliças. As três mais comuns são: quercitina (cebolas, **maçãs**, couve e chá-preto), campferol (rabanete, couve, escarola e nabo) e mirecitina (vinhos e suco de uva). A ingestão média é de cerca de 25mg por dia em muitos países da europa, mas pode variar de acordo com os hábitos alimentares dos indivíduos.

- **Antocianinas:** são compostos vermelhos, roxos ou azuis, responsáveis pela cor de frutas como amora, framboesa e do vinho tinto. O vinho tinto contém cerca de 20mg por 100ml e as frutas cerca de 50 mg por 100g.

- **Catequinas:** são encontradas no chá e no vinho tinto em concentrações altas. Quase 35% do peso seco do chá pode ser de polifenóis, principalmente na forma de catequinas. No vinho tinto, são encontradas cerca de 20mg de catequinas por 100ml. Altas quantidades de catequinas são encontradas no chocolate, cerca de 50mg/100g. Estima-se que da ingestão total de polifenóis, é cerca de 100-200mg por dia, o que é relativamente alto, em comparação à ingestão de outros nutrientes antioxidantes, tais como vitamina E (15mg/dia), vitamina C (90mg/dia) e vitamina A (5mg/dia)( 900(ug/d).<sup>89</sup>

**a.2) FITOSTERÓIS:** têm uma estrutura semelhante ao colesterol. São encontrados em vários alimentos de origem vegetal como óleos vegetais (girassol, soja, canola...) frutas e hortaliças. A ingestão de fitosteróis causa um aumento de excreção de colesterol, tanto dietético como biliar. A recomendação indicada é de 200mg a

400mg por dia, fornecidos por uma dieta balanceada com quantidades adequadas de vegetais.

**a.3) FITOESTRÓGENOS:** são uma possível forma natural de terapia de reposição hormonal devido a sua estrutura química semelhante ao hormônio humano estradiol, cujas propriedades apresentam semelhança ao tratamento de reposição hormonal para mulheres com risco de desenvolvimento de osteoporose, auxiliando nos sintomas da menopausa (calorões ou fogachos), reduzindo o risco de câncer de mama, de câncer de intestino e outros; doenças cardiovasculares e melhorando a função cerebral. São encontrados na soja, cravo, frutas cítricas, alfafa, brócolis, alho, cenoura, funcho, erva-doce, trigo, ginseng, sementes de girassol, gergelin e nozes. Os fitoestrógenos foram identificados em mais de 800 vegetais. são subdivididos em isoflavonas e lignanas.<sup>90</sup>

- **Isoflavonas:** reduzem a formação de tumores. As principais fontes são os grãos de soja e cravo. Estima-se que os asiáticos consumam o equivalente a 10-35g de soja ao dia, o que equivale a ingestão de isoflavonas de 25-100mg.<sup>91</sup>

- **Lignanas:** podem prevenir e controlar câncer de mama e de pulmão e normalizar a atividade estrogênica. São encontradas em muitos cereais, grãos, frutas e vegetais, mas a fonte mais rica é a semente de linhaça e outras sementes oleoginosas como o gergelin. As lignanas necessitam ser convertidas pelas bactérias do trato digestivo a fim de se tornarem bioativas.

- **Flavóides:** são largamente distribuídos no reino vegetal, sendo encontrados em diversos vegetais, grãos, ervas e chá verde.

- **Coumestrol:** presente no broto de alfafa e vários feijões.

**a.4) FITATO:** apesar de suas propriedades antinutricionais (efeito potencial na absorção do ferro) o fitato dietético tem propriedades benéficas, tais como efeitos

antioxidantes e anticarcinogênicos. O ácido fítico (por meio de sua ligação ao ferro no trato gastrointestinal) pode prevenir a possível formação de radicais livres no cólon e pode evitar a utilização excessiva de ferro por mulheres pós-menopausa, que necessitam menos ferro. É encontrado em cereais integrais, leguminosas, sementes, nozes e, em baixas concentrações, nos vegetais.<sup>92,93</sup>

**a.5) Ácidos Fenólicos:** sua principal característica é a presença de um anel benzeno, grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos hidroxila e/ou metoxila na molécula, conferindo propriedades antioxidantes tanto para os alimentos quanto para o organismo. Os antioxidantes fenólicos funcionam como seqüestradores de radicais livres e, algumas vezes, como quelantes de metais, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo.

**a.6) CAROTENÓIDES:** o licopeno é um carotenóide que não apresenta atividade de vitamina A e suas propriedades biológicas devem ser atribuídas a outros mecanismos de ação. Estão fortemente ligados às macromoléculas dos alimentos e sua potencialização se dá em presença de gordura que será o carreador para dentro da célula.

**b) PREBIÓTICOS:** (inulina e frutooligosacarídeos - fos), componentes não digeríveis dos alimentos que chegam ao cólon com produção de efeitos benéficos sobre a flora intestinal. São considerados fibras alimentares.

**b.1) INULINA:** é um polímero de glicose extraído da raiz da chicória ou produzida industrialmente a partir da sacarose.

**b.2) FRUTOOLIGOSACARÍDEOS (FOS):** são produzidos a partir da sacarose por atuação da enzima frutogiltransferase, enzima obtida do fungo *Aspergillus niger*. Desempenham funções fisiológicas no organismo como: alterações do trato intestinal com efeito de redução de metabólicos tóxicos; prevenção da diarreia ou

de constipação intestinal (por alteração na flora intestinal), redução do desenvolvimento de câncer, redução do colesterol e dos triglicerídeos, controle da pressão arterial, produção de nutrientes e aumento de disponibilidade de minerais. São encontrados na cebola (alimento rico), alho, tomate, aspargos, alcachofra, banana, cevada, centeio, aveia, trigo e mel.

### **2.5.3.2 ANIMAL**

**a) PROBIÓTICOS:** são organismos vivos que ao serem ingeridos exercem efeitos benéficos no balanço da flora bacteriana intestinal. Podem ser componentes de alimentos industrializados presentes no mercado como os produtos lácteos (iogurte, leite fermentados) ou na forma de pó ou cápsulas.

Como funções benéficas dos probióticos pode-se citar o efeito sobre o sistema imunológico, prevenção de diarreias e do câncer de cólon e redução do colesterol.<sup>94</sup>

**b) ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA-3:** estão indicados na prevenção e controle de doenças cardiovasculares, impedindo a formação de placas de gordura nas artérias. Também aumentam a resistência do sistema imunológico às infecções e agem nos processos de depressão. São ricos em zinco e selênio, encontrados nos peixes principalmente os de água fria e óleos de peixe.<sup>93, 95</sup>

Dentre os compostos com efeito antioxidante, pode-se destacar algumas vitaminas que, por possuírem propriedades lipofílicas, exerceriam um efeito antiaterogênico através da sua incorporação a partículas do LDL-colesterol, tornando-o menos sensível à oxidação. As vitaminas C, E e os carotenóides são exemplos disso, pois demonstraram uma capacidade *in vitro* de aumentar a resistência do LDL-colesterol à oxidação. No entanto, para a prática clínica, estudos com suplementação destas vitaminas mostram que sua ingestão dissociada do

alimento deve ser cuidadosa, já que existem evidências apontando que a suplementação pode aumentar o risco de neoplasias e outras doenças. Portanto, a recomendação de uma alimentação rica em frutas e vegetais diversificados, que forneçam doses apropriadas de antioxidante, e que certamente contribuiriam para a manutenção da saúde, seria a conduta mais correta, sempre, levando em consideração as necessidades nutricionais individuais.<sup>96, 97</sup>

Como o envelhecimento está associado a um complexo de interações e alterações que envolvem um indivíduo e o ambiente onde vive, o seu sucesso pode contar com uma dieta nutricionalmente completa (equilibrada) e com exercícios adequados associados para contrapor algumas das mudanças fisiológicas relacionadas à idade. Considerando-se a “cascata” de eventos metabólicos-nutricionais envolvidos desde a formação do embrião até a morte do indivíduo adulto, muito pouco se sabe a respeito destes mecanismos e de sua sincronia. No entanto, de uma maneira geral, durante o crescimento e desenvolvimento corporal, os processos anabólicos (síntese) parecem exceder os catabólicos (degradação). Uma vez que o corpo atinge a maturidade fisiológica, a taxa catabólica torna-se maior do que a taxa anabólica. Conseqüentemente, esta mudança metabólica levaria à perda de células e a vários graus de menor eficiência com função orgânica deficiente, o que poderia explicar a perda progressiva de massa corporal magra, característica do processo de envelhecimento, bem como alterações metabólico-fisiológicas que levariam a um declínio na função orgânica sistêmica. No entanto, ainda permanecem dúvidas quanto aos mecanismos genéticos e ambientais que podem estar influenciando tais mudanças.<sup>5</sup>

Alguns alimentos funcionais, fontes de benefício potencial para saúde são descritos na Figura 1. <sup>98, 93, 90, 99</sup>

<b>Componente/Classe</b>	<b>Fonte</b>	<b>Benefício Potencial</b>
<b>Carotenóides</b>		
Alfa-Caroteno	Cenoura	Neutralizam os radicais livres
Beta-Caroteno	Frutas e vegetais	Neutralizam os radicais livres
Luteína	Vegetais verdes	Contribuem manutenção da visão
Licopeno	Tomate e produtos com tomate (ketchup, molho)	Reduz risco neoplasia de próstata
Zeanzentina	Ovos, frutas cítricas, cereais	Contribuem manutenção da visão
<b>Colágeno Hidrolisado</b>		
Colágeno Hidrolisado	Gelatina	Melhoria de sintomas associados com a osteoartrite
<b>Fibra Dietética</b>		
Fibras Insolúveis	Trigo	Reduzem risco neoplasia de mama e colón
Beta Glucana	Aveia	Reduz risco de doença cardiovascular
Fibra Solúvel	Frutas e vegetais	Reduz risco de doença cardiovascular
Grãos Inteiros	Cereais em grãos	Reduz risco de doença cardiovascular
<b>Ácidos Graxos</b>		
Ômega 3 – DHA/EPA	Peixe, atum e óleo de peixe	Reduz risco de doença cardiovascular, melhoria nas funções mentais e da visão
Ômega 6 Ác.Linolêico	Óleos vegetais	Reduz risco de doença cardiovascular
<b>Flavonóides</b>		
Antocianinas	Frutas	Neutralizam os radicais livres e risco de

Catequinas	Chás	Neutralizam os radicais livres e risco de neoplasias
Flavononas	Frutas cítricas	Neutralizam os radicais livres e risco de neoplasias
Flavonas	Frutas e vegetais	Neutralizam os radicais livres e risco de neoplasias
<b>Glicosinatos, Indóis e Isocianatos</b>		
Sulforaname	Vegetais crucíferas (brócolis, couve-flor, couve)	Neutralizam os radicais livres e risco de neoplasias
<b>Fenóis</b>		
Ácido caféico, ferrúlico	Frutas e vegetais	Antioxidantes ativos, reduzem risco de doenças degenerativas, doenças do coração e dos olhos
<b>Plantas esteróis</b>		
Éster Stanol	Cereais, soja, trigo, óleo de madeira, vinho tinto	Diminuem níveis de colesterol inibindo sua absorção
<b>Prebióticos/Probióticos</b>		
Fruto-oligosacarídeos	Cebola, alho	Melhoria da saúde gastrointestinal
Lactobacillus	iogurte, leite fermentado	Melhoria da saúde gastrointestinal
<b>Saponinas</b>		
Saponinas	Soja em grãos, alimentos que contêm soja, proteína da soja nos	Baixam o LDL-colesterol, contêm enzimas contra neoplasias

alimentos		
<b>Proteína da Soja</b>		
Proteína da soja	Soja em grãos, alimentos que contêm soja	25 gramas ao dia, teriam efeito protetor na redução do risco doença cardíaca
<b>Fitoestrógeno</b>		
Isoflavonas (Daidzeína, Genisteína)	Soja em grão, alimentos que contêm soja	Reduz sintomas da menopausa, tais como fogachos
Lignanas	Vegetais	Proteção contra doenças cardíacas e neoplasias, reduz LDL-colesterol, colesterol total e triglicerídeos
<b>Sulfides/Tiols</b>		
Sulfeto Alílico	Cebola, azeitona, alho	Reduz LDL-colesterol, manutenção sistema imunológico
Trissulfeto Metil Alílicos	Vegetais crucíferos	Reduz LDL-colesterol, manutenção sistema imunológico
<b>Taninos</b>		
Pró antocianinas	Chocolate, cacau	Reduz risco de doença cardiovascular

**Figura 1.** Componentes, fontes e benefícios à saúde dos alimentos funcionais.

## 2.5.4 FLAVONÓIDES

### 2.5.4.1 Aspectos Gerais dos Flavonóides

Flavonóides compõem uma ampla classe de substâncias de origem vegetal. Pertencem ao grande grupo dos compostos fenólicos presentes nos vegetais na forma livre ou ligados à açúcares (glicosídeos) e proteínas, divididos em grandes grupos:

- os pouco distribuídos na natureza: pirocatecol, hidroquinona e resorcinol
- polímeros: taninos e ligninas
- largamente distribuídos na natureza: flavonóides e derivados, os ácidos fenólicos (ácido benzóico) e as cumarinas.

Sua estrutura básica é formada por C6-C3-C6, sendo os compostos mais diversificados do reino vegetal. Neste grupo encontram-se as antocianinas, flavonas, flavonóis e, com menor frequência, as isoflavonas.

Constituem um grupo de moléculas que se apresentam amplamente distribuídas no reino vegetal. São estruturas polifenólicas de baixo peso molecular sendo considerados metabólitos vegetais secundários presentes em frutas e vegetais. Atualmente já foram identificados mais de 6.400 substâncias químicas diferentes estruturalmente pertencentes ao grupo dos flavonóides. Estes compostos possuem uma série de propriedades que os fazem atuar sobre sistemas biológicos de forma benéfica para a saúde humana.<sup>100</sup>

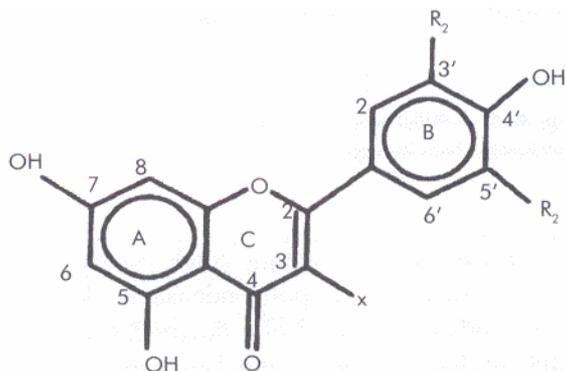
Os flavonóides eram considerados vitaminas com efeitos mutagênicos e carcinogênicos, posteriormente, observou-se efeitos opostos como antimutagênicos e anticarcinogênicos. Conferem propriedades antiinflamatórias, devido aos efeitos antioxidantes e a habilidade de atuar sobre mediadores da inflamação, tais como prostaglandinas e leucotrienos. Estes polifenóis são compostos relacionados pelo grupo flavona, biossinteticamente derivados da fenilalanina e malonato.<sup>101</sup>

Estudos *in vitro* sugerem que os flavonóides são passíveis de inibir ou, muitas vezes, induzir uma grande variedade de sistemas de enzimas em mamíferos. Algumas destas enzimas intervêm na divisão e proliferação celular, agregação de plaquetas, detoxificação e respostas inflamatórias e imunes. Frente a isso, não nos surpreende a conexão estabelecida dos flavonóides com as diferentes etapas do

processo carcinogênico, sobre o sistema imune e sobre a homeostase em animais e sistemas celulares.

Possuem atividade antiinflamatória, propriedades antioxidantes tais como ação inibitória de enzimas, excelente capacidade de quelar metais como o ferro e atuação como captadores e neutralizadores de radicais de oxigênio (ROs), uma vez que a presença destes tem sido relacionada a certas doenças crônico-degenerativas como: doenças auto-imune, câncer e doença de Parkinson.<sup>102</sup>

Os flavonóides, quando ligados aos carboidratos, são mais estáveis durante a ingestão dos alimentos. Contudo, perdas significativas podem ocorrer quando a camada externa das frutas, tais como maçãs e pêras, são removidas antes do seu consumo ou durante o processo industrial. Esta é razão pela qual o conteúdo dos polifenóis do vinho tinto é muito menor do que nas uvas das quais é produzido. A seguir é apresentada a forma estrutural dos flavonóides. Figura 2.



**Figura 2.** Esquema da estrutura geral dos Flavonóides.

#### 2.5.4.2 Aspectos Nutricionais dos Flavonóides

Pode-se dizer que os hábitos alimentares dos seres humanos varia de acordo com a cultura de cada grupo populacional e com isso a ingestão diária de flavonóides também varia. Alguns estudos estimam que o valor médio de consumo para os flavonóides fica em torno de 23 mg. As principais fontes alimentícias de flavonóides e flavonas são, entre outras, o chá preto, as cebolas, as maçãs e a pimenta preta.<sup>103</sup>

Destes alimentos, a *maçã* e a pimenta preta são os que contêm maior quantidade de quercitina (dos compostos bioativos é o que aparece em maior quantidade), perfazendo um total de 4g/kg.

A *maçã* contém uma quantidade de flavonóides que excede a outros antioxidantes da dieta, como o  $\beta$ -caroteno e a vitamina E, possuindo quase a quantidade de um terço do potencial antioxidante da vitamina C. Os flavonóides apresentam uma contribuição importante no potencial antioxidante da dieta humana.

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que o consumo regular de frutas e vegetais pode conferir um efeito protetor com redução de 50% do risco para câncer digestivo e das vias respiratórias.<sup>104, 105</sup>

#### 2.5.4.3 Absorção e Metabolismo dos Flavonóides

A bio-transformação dos flavonóides ocorre em dois pontos distintos:

- primeiramente, no fígado, onde as enzimas de biotransformação atuam sobre os flavonóides.

- segundo, no cólon, que representa uma zona metabolicamente inativa, onde os microorganismos degradam os flavonóides não absorvidos e posteriormente enviam para a corrente sanguínea novamente para sua absorção.

O metabolismo dos flavonóides é intenso e uma quantidade significativa é excretada pela urina após a degradação dos mesmos.<sup>106</sup> As enzimas capazes de executarem a biotransformação dos flavonóides encontram-se no fígado, embora estudos tenham detectado que no rim e no intestino delgado também poderiam existir algumas enzimas capazes de promover esta biotransformação, embora ainda que sejam necessários mais estudos comprovando tal hipótese.<sup>107</sup>

#### **2.5.4.4 Biodisponibilidade dos Flavonóides**

Para que seja possível avaliar os efeitos biológicos dos flavonóides, ou de qualquer composto bioativo ou fármaco, o aspecto mais relevante é a biodisponibilidade. Este parâmetro bioquímico é que permite quantificar a exposição do organismo à substância em estudo.<sup>108</sup>

Diversos fatores influem na sua biodisponibilidade: estrutura química da substância, sua absorção, distribuição e eliminação em cada processo apresentando relevância e valores próprios.<sup>109</sup> Os glucosídeos do flavonol apresentam uma absorção moderada. Mais de 98% da quercitina presente no plasma humano está ligada às proteínas apresentando 70-80% de associação com a albumina humana.

A velocidade de excreção na urina é mais alta após a ingestão de glucosídeos demonstrando forte relação entre a quantidade ingerida e a absorção, metabolismo e eliminação observados.<sup>110</sup>

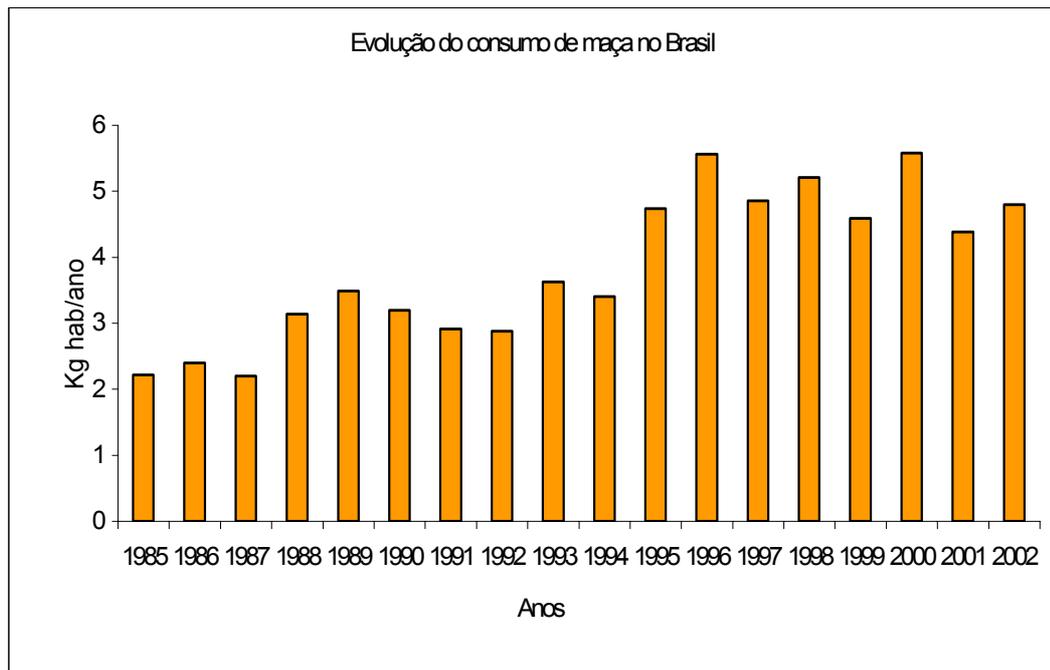
### 2.5.5 MAÇÃ FUJI COMO ALIMENTO FUNCIONAL

Estudos revelam que frutas e vegetais contêm muitos compostos fenólicos, tiols, carotenóides, tocoferóis e glucosinolatos que podem manifestar efeitos protetores por diversos mecanismos. Entre as frutas consumidas nos países ocidentais a maçã merece lugar de destaque.

A *maçã* é um componente muito importante da dieta, pois a partir do levantamento do consumo alimentar na Holanda (*Dutch Food Consumption Survey*) e de volumes de flavonóides previamente analisados de frutas, vegetais e bebidas, Hertog e outros determinaram que *maçãs* são o terceiro maior alimento rico em flavonóides da dieta humana atrás do chá preto e da cebola.<sup>111</sup>

Na Finlândia, junto com cebolas, as maçãs estão no topo dos fornecedores. Nos Estados Unidos, 22% dos fenólicos de frutas consumidas são provenientes da maçã, fazendo dela a maior fonte. Torna-se cada vez mais claro que um grande conjunto de doenças crônicas, como as do coração e câncer, tem a ocorrência de oxidação como um componente principal de suas fisiopatologias. O consumo da maçã vem sendo cada vez mais associado inversamente com a incidência de câncer de pulmão, doença cardiovascular reduzida, doença pulmonar obstrutiva crônica e risco de choque trombótico.<sup>112</sup>

No Brasil três cultivares de maçã são os mais plantados: *Gala*, *Golden* e *Fuji*, sendo os maiores produtores Santa Catarina e Rio Grande do Sul. É também importante destacar que nos últimos vinte anos tanto a produção quanto o consumo per capita da maçã vem aumentando de modo significativo, como pode ser observado na Figura 3.<sup>113</sup>



**Figura 3.** Evolução do consumo per capita no Brasil nos últimos dezoito anos.

A maçã da variedade “Fuji”, atualmente, é uma das mais importantes cultivares de maçãs, perfazendo 45% do total da produção no Brasil.<sup>113</sup> Apresenta excelente aceitação por parte dos consumidores devido ao seu paladar e as reduzidas perdas de qualidade durante seu armazenamento.<sup>114</sup>

Esta cultivar introduzida no Brasil na década de 1960 é originária da Estação Experimental de Morioka no Japão, onde em 1939 foi lançada, como resultado do cruzamento das cultivares Jonet x Delicious x Rouge.<sup>115</sup>

Desde a criação da cultivar Fuji no Japão, surgiu um grande número de mutações somáticas na variedade. No Brasil, foram recomendadas a Fuji 1 e Fuji 2, com coloração do fruto vermelho rajado intenso por conseguinte com maior pigmentação e percentual de flavonóides. O fruto já foi devidamente analisado quanto às características organolépticas tendo a mesma análise estabelecido como padrões de controle de qualidade do fruto a análise dos teores sólidos solúveis,

acidez, firmeza da polpa e degradação do amido.<sup>116</sup> Por este motivo, investigações em modelos experimentais sobre a maçã como alimento funcional, são pertinentes.

A comparação dos compostos antioxidantes da Fuji em relação a outros cultivares feita por Imeh e Khokhar mostrou uma quantidade total de fenóis (peso fresco) de  $330.1 \pm 19.4$  mg CtE/100g).<sup>117</sup>

### 2.5.5.1. Análise Bromatológica da Maçã Fuji

Valor Nutritivo de 100 gramas de		
MAÇÃ- FUJI		
Nutriente	Unidades	Valor por 100 gramas de porção comestível
<b>Macro Componentes</b>		
Água	g	83,93
Energia	Kcal	59
Energia	Kj	247
Proteína	g	0,19
Lipídeos (total)	g	0,36
Carboidratos	g	15,25
Fibra dietética (total)	g	2,7
Cinzas	g	0,26
<b>Minerais</b>		
Cálcio, Ca	mg	7
Ferro, Fé	mg	0,18
Magnésio, Mg	mg	5
Fósforo, P	mg	7
Potássio, K	mg	115

Sódio, Na	mg	0
Zinco, Zn	mg	0,04
Cobre, Cu	mg	0,04
Manganês, Mn	mg	0.04
Selênio, Se	mcg	0,3
<b>Vitaminas</b>		
Vitamina C, Ácido Ascórbico	mg	5,7
Tiamina (B1)	mg	0,01
Riboflavina (B2)	mg	0,01
Niacina	mg	0,07
Ácido Pantotênico(B5)	mg	0,06
Vitamina B6	mg	0,04
Folato (B9)	mcg	2,8
Vitamina (B12)	mcg	0
Vitamina A, IU	IU	53
Vitamina A, RE	Mcg RE	5
Vitamina E	Mg ATE	0,32

**Figura 4.** USDA Nutrient Database for Standard Reference, Release 13 (November 1999).

Diversos estudos têm mostrado que a maçã pode ter uma atividade funcional importante para a saúde humana. Como, por exemplo, podem ser citadas investigações que analisaram a atividade antioxidante da casca da maçã e seu possível efeito anti-tumoral. Resultados encontrados em dois estudos realizados por Wolfe, et al.<sup>118, 119</sup> mostraram que a casca da maçã contém alto conteúdo de polifenóis antioxidantes, que uma grama de casca de maçã possui atividade antioxidante equivalente a 220 mg de vitamina C, e que estas propriedades antioxidantes tendem a se intensificar caso a casca seja congelada. O mesmo grupo de pesquisa mostrou a casca de maçã apresentou efeito anti-proliferativo em

linhagens celulares de câncer e fígado (Hep62). No caso, a dose efetiva para tal efeito foi de  $1,88 \pm 0,01$  mg/mL. Outros estudos têm estudado o efeito da maçã sobre a oxidação do LDL-colesterol. Entretanto, os resultados são controversos, pois enquanto Pearson e cols.<sup>120</sup> observaram diminuição dos níveis de LDL-colesterol pela maçã Lotito e Frei<sup>121</sup> não observaram o mesmo resultado em ensaios in vitro e in vivo. Apesar disto, estudos complementares parecem ser necessários antes de se estabelecer o quanto a maçã pode afetar a modulação da oxidação de moléculas como o LDL-colesterol.

Estudos adicionais também têm sugerido que suco de maçã pode diminuir tanto o estresse oxidativo quanto a disfunção cognitiva em camundongos com deficiência genética e dietética.<sup>122</sup>

Apesar destas evidências existe necessidade de se responder algumas questões que poderiam estar relacionadas com o efeito de frutas como a maçã na saúde humana: (1) a maçã poderia ter efeito sobre a longevidade? (2) a maçã poderia modular outras variáveis metabólicas associadas à manutenção da homeostasia e funções corporais? Entretanto, para responder estas questões se faz necessário o uso de modelos experimentais que permitam a obtenção rápida e acurada de resultados. Este é o caso da mosca-das-frutas *Drosophila melanogaster*.

## **2.6. *Drosophila melanogaster* COMO MODELO EXPERIMENTAL**

Devemos considerar a pesquisa experimental em animais de laboratório como um avanço científico na realidade do nosso país que, até o presente momento, tem investido muito pouco nessa área, pois acaba aceitando resultados das pesquisas básicas feitas nos países desenvolvidos. Os referidos estudos fornecem valiosa

informação, existem menos limitações bioéticas e nos permitem realizar pesquisas longitudinais e de intervenção, que são as principais dificuldades na pesquisa clínica humana.<sup>123</sup>

As vantagens do uso de *Drosophila melanogaster* em estudos de envelhecimento devem-se à alta capacidade reprodutiva deste organismo, seu curto tempo de geração, pequeno tamanho, cultivo fácil e barato, pequeno número de cromossomos, alta definição dos cromossomos politênicos, grande número de bem conhecidas e igualmente bem mapeadas mutações (mais de 3000) e curta longevidade. Além disso, com exceção das células germinativas, o adulto é composto unicamente por células pós-mitóticas, o que permite estimar a contribuição de modificações epigenéticas ao processo de senescência, particularmente a detecção de eventos modificadores não enzimáticos como racemização, desaminação e glicosilação de proteínas.<sup>124</sup>

Mesmo havendo grandes diferenças estruturais e fisiológicas entre *Drosophila* e mamíferos, resultados obtidos em *Drosophila* podem contribuir grandemente para nossa compreensão básica do processo de envelhecimento como foi no início deste século em relação a princípios básicos de genética<sup>125</sup>

*Drosophila*, e, particularmente, *D. melanogaster* foi e continua sendo usada para demonstrar:<sup>126</sup>

- efeitos de várias drogas e a possível influência destas para a o envelhecimento e longevidade;
- efeitos aceleradores das radiações ionizantes sobre o envelhecimento;
- evidências para os primeiros mutagênicos químicos descobertos;
- primeira demonstração de genes letais;

-grande número de mudanças fisiológicas relacionadas com a idade, tanto em nível de órgãos quanto em nível celular, mais tarde confirmadas em mamíferos, primeiramente descobertas em *Drosophila*.

Por último, a maioria, senão todas as teorias do envelhecimento, têm sido testadas, confirmadas, rejeitadas ou modificadas a partir de estudos feitos em *Drosophila*.<sup>127</sup>

O fato de o indivíduo adulto de *Drosophila* ser quase inteiramente composto por células pós-mitóticas tem sido apontado como o principal empecilho para comparações entre este organismo e mamíferos. Porém, é importante lembrar que muitas células importantes no contexto da senescência em mamíferos são células de longa vida pós-mitótica, como os neurônios.

Com base nas considerações e revisão de literatura acima apresentada, a presente tese apresenta os objetivos descritos a seguir.

---

*OBJETIVOS*

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da Maçã Fuji *in natura* e desidratada no tempo de vida (longevidade/mortalidade) e em indicadores do metabolismo e da fisiologia ao longo do envelhecimento de *Drosophila melanogaster*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar o efeito da Maçã Fuji *in natura* e desidratada em diferentes concentrações, em adultos de *Drosophila melanogaster* (machos e fêmeas) nos seguintes parâmetros:

- a) longevidade (média e máxima) e taxa de mortalidade;
- b) indicadores do metabolismo fisiológico e bioquímico em diferentes idades;
- c) padrões de dano oxidativo aos lipídios em diferentes idades.

---

*MATERIAIS E MÉTODOS*

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1.DELINEAMENTO

O presente estudo apresentou um delineamento prospectivo, de intervenção e analítico.

### 4.2.POPULAÇÃO E AMOSTRA

No presente estudo foi utilizado o modelo experimental *Drosophila melanogaster* proveniente de Oregon, EUA (Oregon-R), cedido pelo Prof.Dr. Gilson Luis da Cunha, que obteve suas linhagens a partir do Laboratório de Drosophila do Departamento de Genética da UFRGS e cultivado no Laboratório de Biologia do Desenvolvimento e Embriologia (PUCRS) . A obtenção da amostra investigada ocorreu após a ovoposição durante uma hora de aproximadamente 500 casais da espécie. A amostra foi mantida em condições controladas de temperatura (25°C +/- 1°C); umidade de 80% e luminosidade constante.

### **4.3.MEIO DE CULTURA PARA A CRIAÇÃO E INVESTIGAÇÃO**

Dois meios de cultura foram utilizados para o desenvolvimento do estudo aqui descrito:

#### **4.3.1 Protocolo para o Meio de Cultura Padrão**

Ingredientes para o meio de cultura para os animais controle:

100g de farinha de centeio;

50g de açúcar mascavo;

10g de Nipagin;

10g de agar-agar;

1000ml de água destilada

Modo de preparo:

O Nipagin e o agar-agar foram dissolvidos em 150ml de água destilada. Após, foram adicionadas a farinha de centeio, o açúcar mascavo e o restante da água destilada. Tudo foi homogeneizado e levado ao microondas por mais ou menos 7 minutos. Retirou-se o meio do forno, mexeu-se novamente e colocou-se por mais 3 minutos o meio cuidando para que não derramasse.

O meio foi colocado em vidros grandes para resfriamento e posterior armazenamento em geladeira em temperatura de 4°C até ser utilizado.

### **4.3.2 Protocolo para Meio de Ovoposição Vermelho**

A fim de se obter ovos para a realização dos experimentos, o seguinte meio foi utilizado:

Ingredientes

½ litro de água destilada;

8g de agar-agar;

1 ml ácido propiônico;

Corante “Panceau”.

Modo de preparo:

A água destilada, o agar-agar e o fermento foram misturados e aquecidos até temperatura de fervura. Acrescentou-se então uma pitada de corante “panceau”, deixando-se esfriar até a temperatura de 60° C. Foi adicionado 1ml de ácido propiônico. Os vidros-relógio foram limpos com álcool 70% para a distribuição do meio.

Os vidros foram armazenados em geladeira a 4°C até seu uso.

### **4.4 VARIÁVEIS INVESTIGADAS**

As seguintes variáveis foram analisadas :

- a) Longevidade
- b) natureza da dieta
- c) concentração da dieta
- d) tempo de vida
- e) padrões bioquímicos de proteínas, lipídios, glicogênio e dano-oxidativo.

#### 4.4.1 Análise das Variáveis Demográficas: longevidade

Colocou-se as matrizes (n=500), cujos indivíduos tinham uma semana de idade, para ovopositar em meio vermelho por cerca de 3 horas. Trocou-se o vidro de relógio a cada 3 horas, tendo-se ao final 8 vidros-relógio.

Quando já haviam colocado ovos suficientes, as moscas eram retiradas e transferidas para outros tubos, sendo mantidas como os pais da próxima geração.

Quando começaram a nascer as larvas, contou-se 150 indivíduos para cada vidro que continha meio normal para cultivo de *Drosophila melanogaster* com fermento líquido, até os animais puparem.

Os animais levaram em média 10 dias para eclodir e foram considerados OC (Oregon, controle). Estes foram eterizados ao nascer sendo separados, em média 10 casais por vidro.

Para cada tratamento utilizou-se uma média de 45 vidros contendo cerca de 900 animais no total.

Os animais foram repicados (trocados de vidro) nas 3<sup>as</sup> e 6<sup>as</sup> feiras para que houvesse um bom controle do número de indivíduos que morreram por semana;

Os vidros utilizados foram preparados no dia anterior para que houvesse tempo suficiente do meio ficar bem seco, evitando assim que os indivíduos morressem grudados ao serem repicados;

Os indivíduos mortos foram identificados quanto ao sexo e ao tratamento que sofreram tendo as informações registradas devidamente.

Ao repicar os animais, os rótulos dos vidros foram identificados com o tipo de tratamento aplicado, a data em que nasceram e o dia em que foram repicados.

Os vidros receberam cuidados até que o o último indivíduo morresse, passando-se todos os dados para uma tábua de vida.

#### **4.4.2 Dosagem de Lipídios e Triglicerídios Teciduais**

Para determinação dos lipídios totais e triglicerídios foi feito um *pool* de 50 indivíduos que foram congelados em tubos do tipo *ependorf* em freezer (- 20°C);

Na determinação do peso do *pool* de animais, em gramas, utilizou-se a seguinte relação:  $P = \text{peso do ependorf com a amostra} - \text{peso do ependorf sem a amostra}$ .

#### **Determinação dos Lipídios Totais:**

Os lipídios totais do *pool* de 50 animais (*Drosophila melanogaster* - Oregon-R) foram extraídos pelo método do Folch et al., 1957<sup>128</sup> e quantificados através do método da sulfofosvanilina. Os resultados foram expressos em mg/g.

#### **Determinação dos Triglicerídios:**

Os triglicerídios do *pool* de 50 animais (*Drosophila melanogaster* - Oregon-R) foram extraídos pelo método de Folch et al., 1957<sup>128</sup> e, quantificados utilizando-se o Kit da Biodiagnostic (triglicerídeos GPO *trinder*). Os resultados foram expressos em mg/g.

#### **Isolamento e Determinação do Glicogênio:**

O isolamento do glicogênio do *pool* de 20 animais (*Drosophila melanogaster* Oregon-R) foi segundo o método descrito por Van Handel, 1995<sup>129</sup> sendo este quantificado como glicose após hidrólise em HCl e neutralização com Carbonato de

Sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). A glicose foi quantificada utilizando-se o Kit da Biodiagnóstica, método da glicose oxidase. Os resultados foram expressos em mg/g.

#### **Determinação das proteínas:**

As proteínas totais foram quantificadas no meio de extração do glicogênio utilizando-se o método descrito por Lowry et al., 1951<sup>130</sup> tendo a albumina bovina como padrão. Os resultados foram expressos em mg/ml.

#### **Dosagem das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA - Rs )**

Como os radicais livres são continuamente produzidos na fosforilação oxidativa em outros sistemas biológicos, reagem rapidamente com a maioria das moléculas orgânicas. Estes radicais podem reagir com os lipídios de membranas, proteínas, DNA e também glicídeos.<sup>131</sup> Esta técnica foi realizada de acordo com o método descrito por Buege and Aust, 1978.<sup>132</sup>

### **4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da mesma. Para a comparação dos parâmetros metabólicos entre os diferentes tempos de vida (1, 5, 10, 15 e 20 dias) em cada um dos tratamentos foi feita a análise de variância de uma via (ANOVA), seguida do teste paramétrico não complementar de Kruskal-Wallis. A comparação entre as curvas obtidas para os diferentes tratamentos foi feita por análise Multivariada (MANOVA). Todos os dados metabólicos e os de TBA-RS não passaram pelo teste de distribuição de normalidade Kolmogorov Smirnof, o que justifica o uso de um teste não paramétrico (Kruskal-Wallis).

A análise multivariada por regressão logística (método Foward Wald) foi realizada para verificar a indepência das associações significativas observadas através dos testes univariados.

As diferenças entre as médias foram consideradas significativas quando os valores de probabilidade foram iguais ou menores que 0,05. As análises estatísticas foram realizadas com o Programa “Statistical Package for the Social Sciences” (SPSS) versão 11.5.

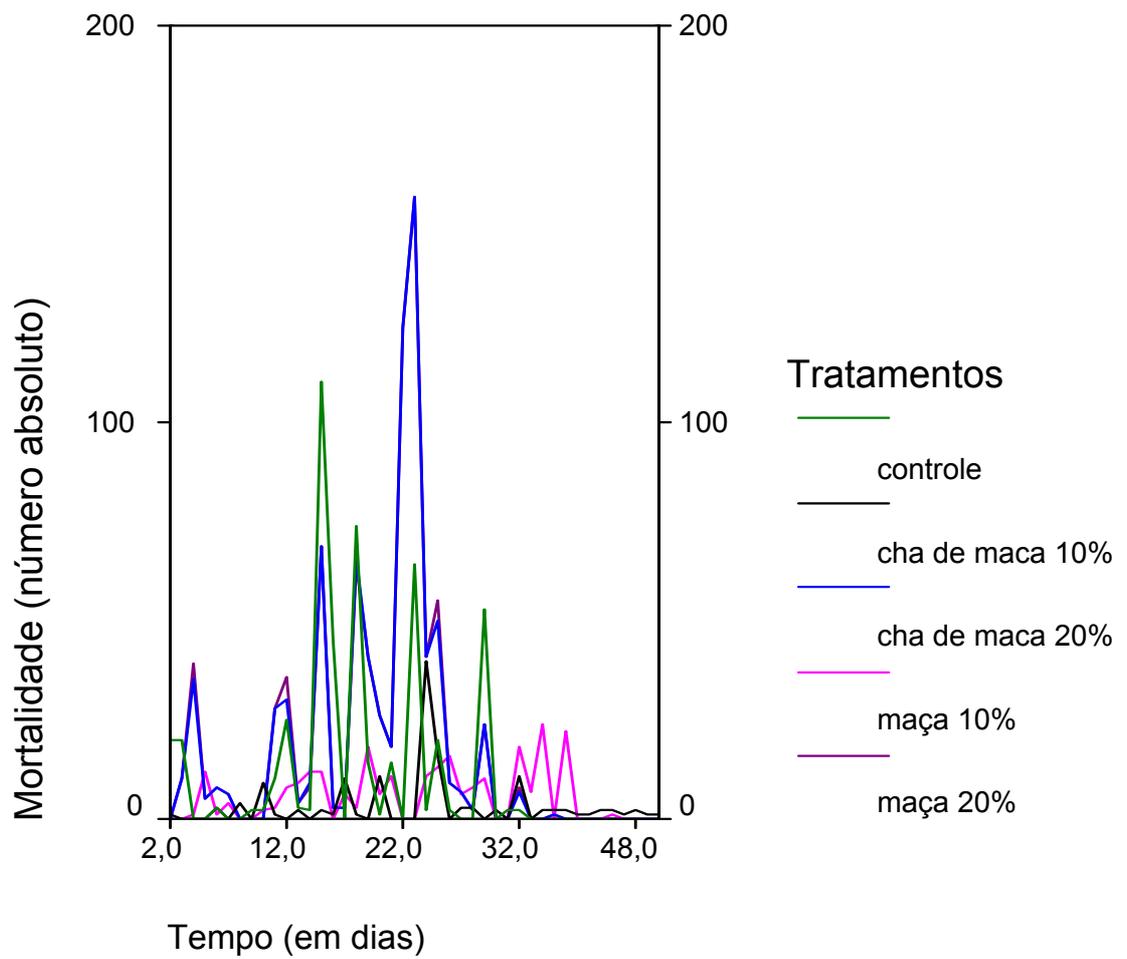
---

*RESULTADOS*

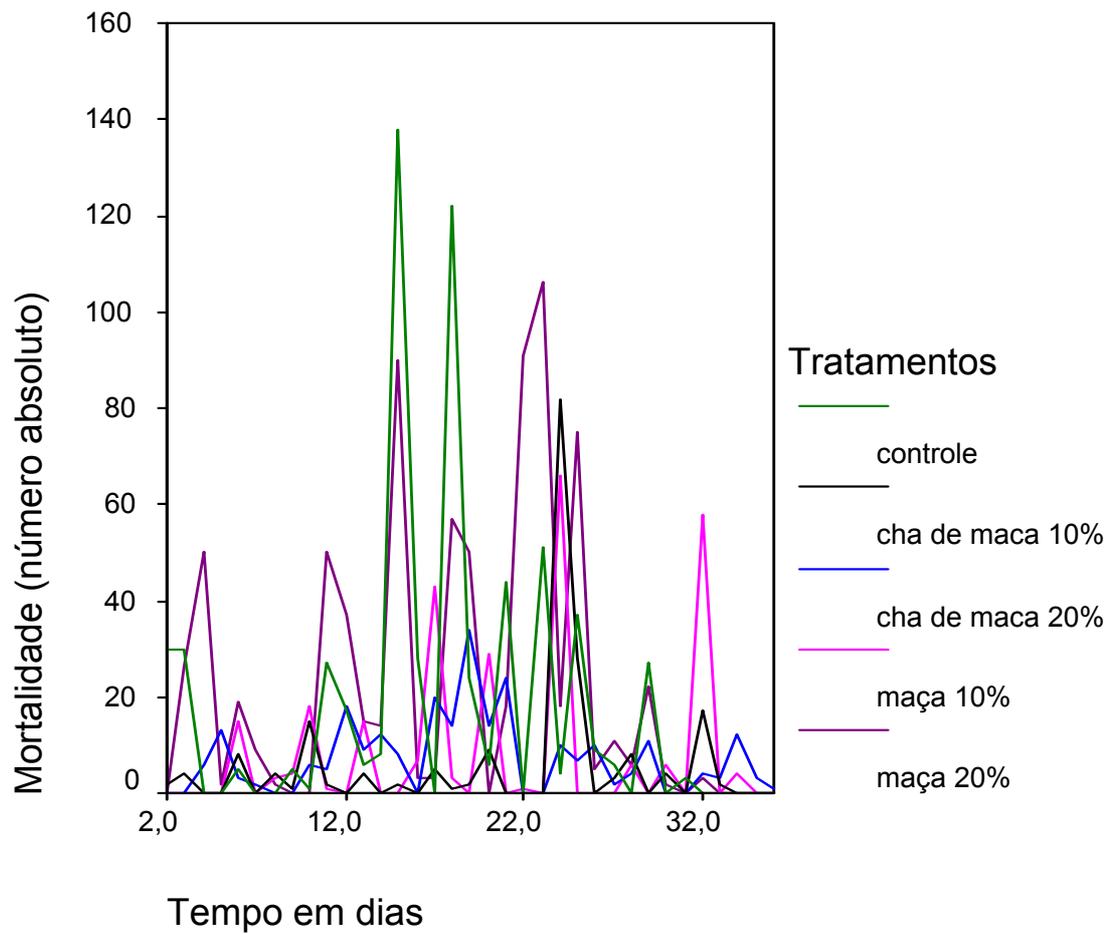
## 5 RESULTADOS

### 5.1 Indicadores Demográficos de Longevidade nos Tratamentos

Um total de 4599 moscas foram acompanhadas do nascimento à morte. Destas, 2450 (53,3%) eram machos e 2149 (46,7%) eram fêmeas. A mortalidade observada entre os sexos e os tratamentos é apresentada nas Figuras 5 e 6. Podemos observar, tanto em machos quanto em fêmeas controle, dois picos intensos e sequenciais de mortalidade entre os 14 e 20 dias de vida. Na população de machos estes picos foram deslocados (22 e 28 dias) com o tratamento de maçã desidratada a 10% e atenuados com todos os outros tratamentos utilizados. Já na população de fêmeas, todos os tratamentos conduziram a uma menor e mais tardia mortalidade.



**Figura 5.** Distribuição da mortalidade em números absolutos de fêmeas de *Drosophila melanogaster* por dia nos diferentes tratamentos.



**Figura 6.** Distribuição da mortalidade em números absolutos de machos de *Drosophila melanogaster* por dia nos diferentes tratamentos

A tábua de vida das moscas tratadas em diferentes dietas é apresentada na Tabela 1.

**Tabela 1.** Expectativa de vida calculada a partir dos dados da tabela de vida de machos e fêmeas de *Drosophila melanogaster* nas diferentes dietas.

Continua

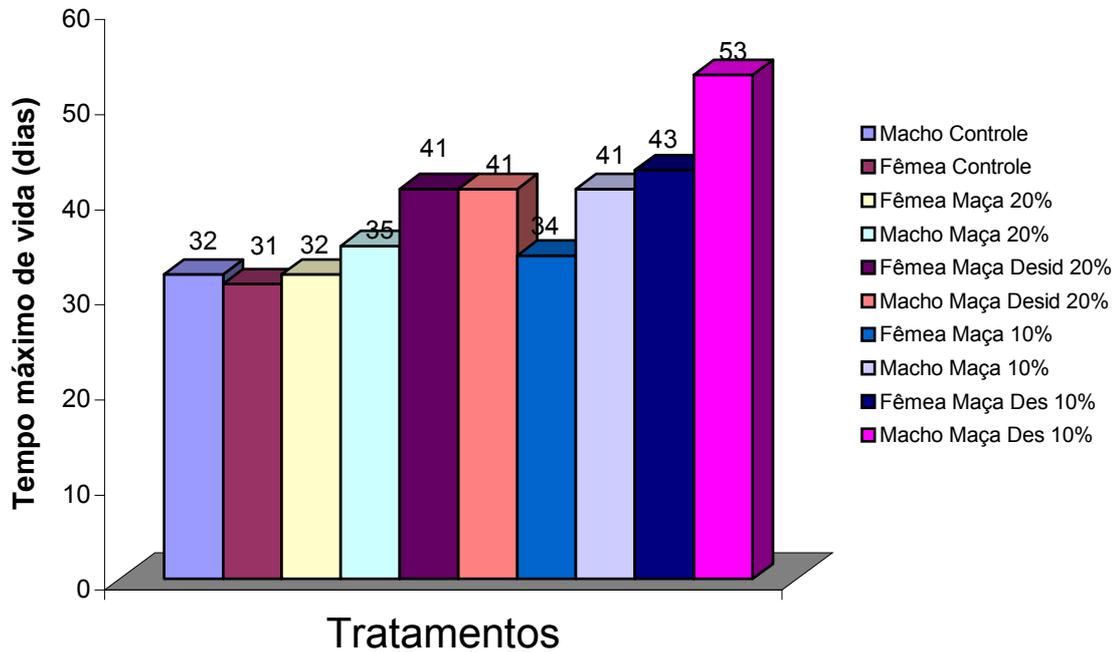
Dias	Fcontrole	Mcontrole	FMa20%	MMa20%	FMD20%	MMaD20%	FMa10%	MMa10%	FMD10%	MMD10%
1	17,141	16,389	17,265	18,832	12,523	13,178	12,756	12,908	18,024	18,747
2	16,141	15,389	16,265	17,832	12,305	12,963	12,509	12,604	17,336	18,049
3	15,806	15,135	15,265	16,832	11,502	12,227	12,296	12,323	17,511	18,106
4	15,487	14,908	14,742	16,043	10,670	11,469	11,715	11,904	17,838	18,269
5	14,487	13,908	14,621	15,780	10,401	11,226	10,807	11,094	17,286	17,654
6	13,487	12,908	13,660	14,885	10,168	11,022	10,533	10,732	16,671	16,972
7	12,574	12,019	12,994	14,043	9,884	10,786	10,047	10,345	16,136	16,333
8	11,574	11,019	12,154	13,156	9,735	10,674	9,706	10,008	15,374	15,498
9	10,574	10,019	11,188	12,156	9,657	10,636	9,502	9,791	14,494	14,551
10	9,619	9,104	10,188	11,156	9,577	10,643	9,385	9,623	13,611	13,543
11	8,660	8,119	9,188	10,156	9,678	10,766	9,352	9,522	12,475	12,394
12	7,849	7,508	8,858	9,548	9,426	10,827	8,682	9,097	11,795	11,327
13	7,299	6,740	8,364	8,958	9,442	10,605	8,165	8,662	10,775	10,553
14	6,349	5,814	7,562	8,010	9,867	11,116	7,978	8,629	9,333	9,091
15	5,378	4,899	6,732	7,114	10,616	12,033	7,900	8,652	7,710	7,437
16	6,210	5,580	6,872	6,902	8,381	9,488	6,749	7,902	8,633	8,297
17	6,246	5,008	5,911	5,936	8,282	8,436	6,765	8,108	7,729	8,269
18	5,246	4,008	4,944	4,964	9,224	8,949	6,990	8,597	5,991	6,824
19	6,264	5,036	4,535	4,545	6,443	6,576	6,576	8,343	7,362	8,106
20	5,769	4,618	4,067	3,901	5,981	6,098	6,274	8,638	6,892	7,702
21	4,802	3,754	3,319	3,102	6,241	6,225	6,576	9,734	5,625	6,555
22	4,217	3,799	2,470	2,213	5,173	6,018	7,664	12,443	5,683	5,763
23	3,217	2,799	2,202	1,926	5,843	6,734	7,536	13,223	4,089	4,204
24	4,425	3,163	2,500	2,514	4,229	4,032	5,698	9,247	4,459	5,685

## Conclusão

Dias	Fcontrole	Mcontrole	FMa20%	MMa20%	FMD20%	MMaD20%	FMa10%	MMa10%	FMD10%	MMD10%
25	3,526	2,293	1,779	2,340	4,644	3,933	6,806	8,898	3,105	4,816
26	3,569	2,767	2,819	3,180	2,934	2,892	3,478	5,680	3,624	5,371
27	2,679	2,333	2,095	2,768	2,386	2,687	3,507	5,450	3,341	4,742
28	1,679	1,700	1,661	2,235	2,088	2,989	3,293	5,631	2,746	3,313
29	0,679	0,700	0,940	1,344	3,357	5,658	4,436	8,035	0,897	0,986
30	2,000	1,500	1,700	2,875	0,833	1,250	1,676	3,022	1,100	1,700
31	1,000	0,500	1,500	1,875	0,500	1,000	0,833	3,367	0,500	1,000
32	0,500	0,000	0,500	0,875	0,000	0,500	0,500	5,643	0,000	0,500
33	0,000	0,000	0,000	2,500	0,000	0,000	0,000	1,300	0,000	0,000
34				1,500	0,000	0,000	0,000	0,833	0,000	0,000
35				0,500	0,000	0,000	0,000	0,500	0,000	0,000

**Legenda:** M = macho, F = fêmeas, Ma = dieta com maçã in natura, MD = maçã desidratada, FMa= fêmea maçã, MMA= macho maçã, FMD= fêmea maçã desidratada, MMD= macho maçã desidratada.

A análise demográfica dos dados apresentados mostrou que em relação ao tempo de vida ou a longevidade máxima, machos mantidos com extrato de maçã a 10% apresentaram um maior tempo de vida como pode ser observado na Figura 7. Neste caso houve um incremento de 21 dias em relação ao grupo de machos mantidos em dieta controle. Nas fêmeas a dieta com maçã a 10% também aumentou o tempo máximo de vida(43 dias) sendo o incremento (12dias) menor do que aquele observado nos machos que receberam o mesmo tratamento.



**Figura 7.** Comparação entre a longevidade máxima de machos e fêmeas de *Drosophila melanogaster* desenvolvidos em diferentes dietas.

Com a finalidade de investigar se a longevidade média diferiu entre as dietas, foi realizada uma análise estatística adicional à análise demográfica, os resultados são apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Comparação entre a longevidade média de machos e de fêmeas de *Drosophila melanogaster* desenvolvidos em diferentes dietas.

Continua

Dietas	Sexo	Média	±dp	N	
Controle	Machos	17,65	6,86	490	
	Fêmeas	16,89	6,55	628	
	Total	17,22	6,70	1.118	a
chá de maçã 10%	Machos	23,79	9,28	137	
	Fêmeas	21,59	7,50	203	
	Total	<b>22,48</b>	8,32	340	b
chá de maçã 20%	Machos	19,33	6,18	783	
	Fêmeas	18,91	7,73	255	
	Total	19,23	6,59	1.038	c
Maçã 10%	Machos	23,35	9,20	244	
	Fêmeas	21,36	7,97	279	
	Total	<b>22,29</b>	8,61	523	b
maçã 20%	machos	19,26	6,28	796	
	Fêmeas	17,61	7,07	784	
	Total	18,44	6,73	1.580	c

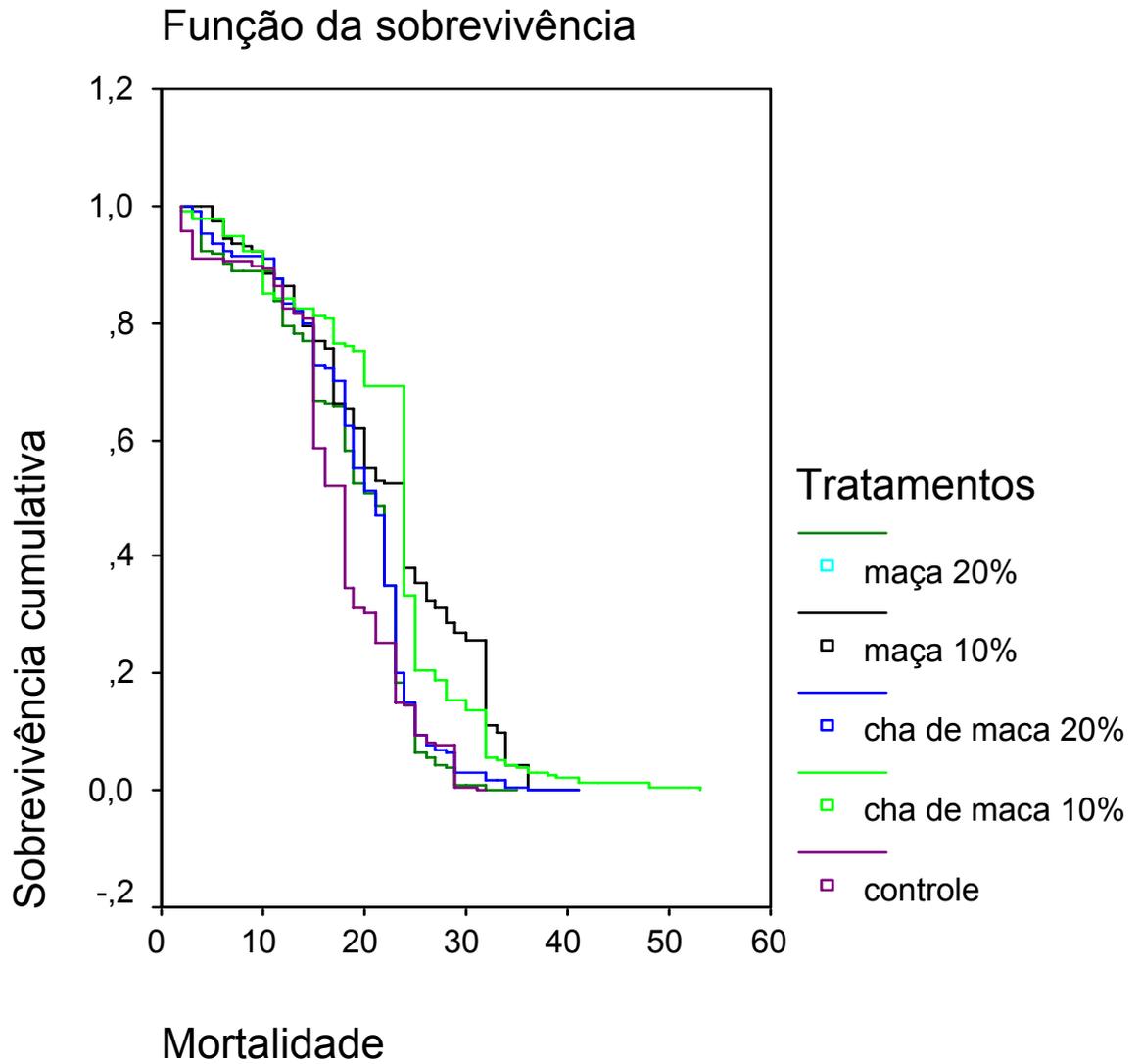
				Conclusão
Dietas	Sexo	Média	$\pm dp$	N
Total	machos	19,62	7,12	2.450
	Fêmeas	18,42	7,37	2.149
	Total	19,06	7,27	4.599

Dp=desvio padrão; n= tamanho amostral; Na comparação das diferentes dietas, letras iguais não diferem estatisticamente com um nível de significância de  $p < 0,05$  pela análise de variância multivariada seguida do teste *post hoc* de Bonferroni.

A análise multivariada mostrou que os machos apresentaram uma longevidade média estatisticamente maior do que as fêmeas ( $F=36,01$ ,  $p=0,001$ ) independente da dieta. Entretanto não ocorreu interação entre sexo e dieta na longevidade das moscas ( $F=2,05$ ,  $p=0,084$ ). Como tal interação não foi estatisticamente significativa, a análise do efeito das dietas sobre a longevidade média, independente dos sexos, mostrou efeito significativo dos mesmos ( $F=31,96$ ,  $p=0,001$ ). No caso o teste *post hoc* associado indicou que moscas submetidas a qualquer tipo de tratamento (diferentes dietas) apresentaram uma longevidade média significativamente maior do que as moscas controle. Já a comparação entre os tratamentos mostrou que o efeito da concentração foi mais relevante do que o tipo de preparo da maçã que foi utilizada no tratamento. Isto porque moscas tratadas tanto com maçã *in natura* quanto com a maçã desidratada em uma concentração de 10% apresentaram uma longevidade média significativamente maior do que as moscas tratadas com uma concentração de 20%.

Os resultados foram confirmados através da análise de sobrevivência feita pelo Teste de Kaplan-Meir e podem ser observados na Figura 8. A comparação da

análise da sobrevivência por regressão de Cox mostrou diferenças significativas entre os tratamentos ( $\chi^2= 15,21$ ,  $p=0,0001$ ) estudadas.



**Figura 8.** Análise da função de sobrevivência pelo teste estatístico de Kaplan-Meir.

## 5.2 Efeito dos Tratamentos a Base de Maçã Associados ao Envelhecimento com Relação aos Parâmetros Metabólicos de *Drosophila melanogaster*

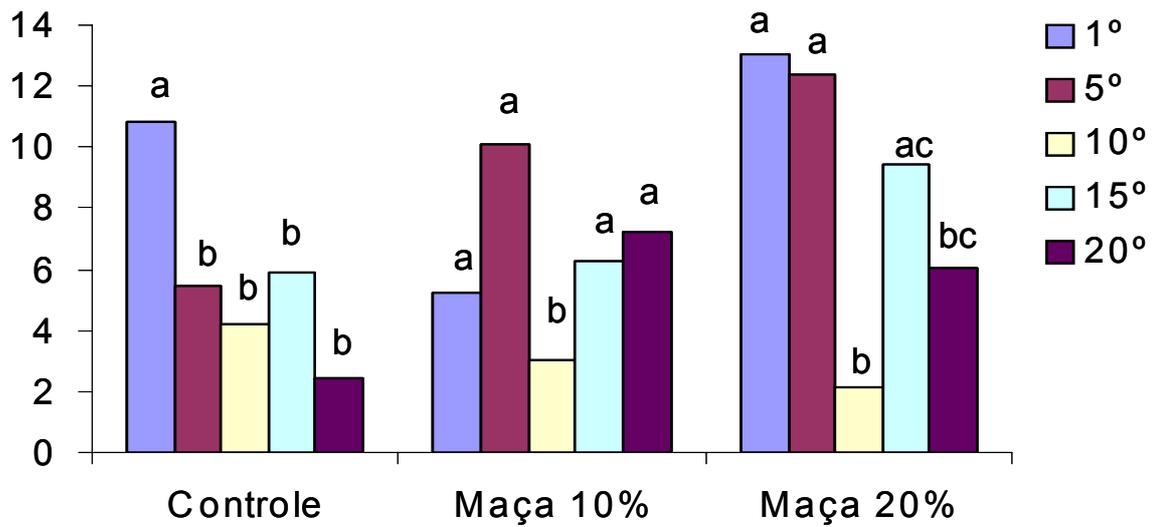
Uma vez que observou-se diferenças significativas na taxa de mortalidade e expectativa de vida das moscas tratadas com diferentes concentrações de maçã, independente da apresentação deste alimento funcional (chá ou fruta), a análise da modulação de variáveis metabólicas realizada considerou apenas três grupos: controle, maçã (chá/fruta) a 10% e a 20%.

Uma vez que não ocorreu distribuição normal nas variáveis investigadas, não foi possível realizar análise multivariada paramétrica da variância. A Figura 9 mostra a distribuição dos valores e os testes de normalidade para cada uma das variáveis investigadas.

A primeira análise feita comparou a modulação das variáveis metabólicas em relação a idade em cada uma das variáveis investigadas em *D. melanogaster*. Os resultados da análise de variância mostraram modulação das variáveis investigadas influenciadas pelo sexo, idade e tipo de dieta. A Tabela 3 apresenta o resumo estatístico observado.

Nas fêmeas, as seguintes associações estatisticamente significativas foram observadas e são descritas abaixo.

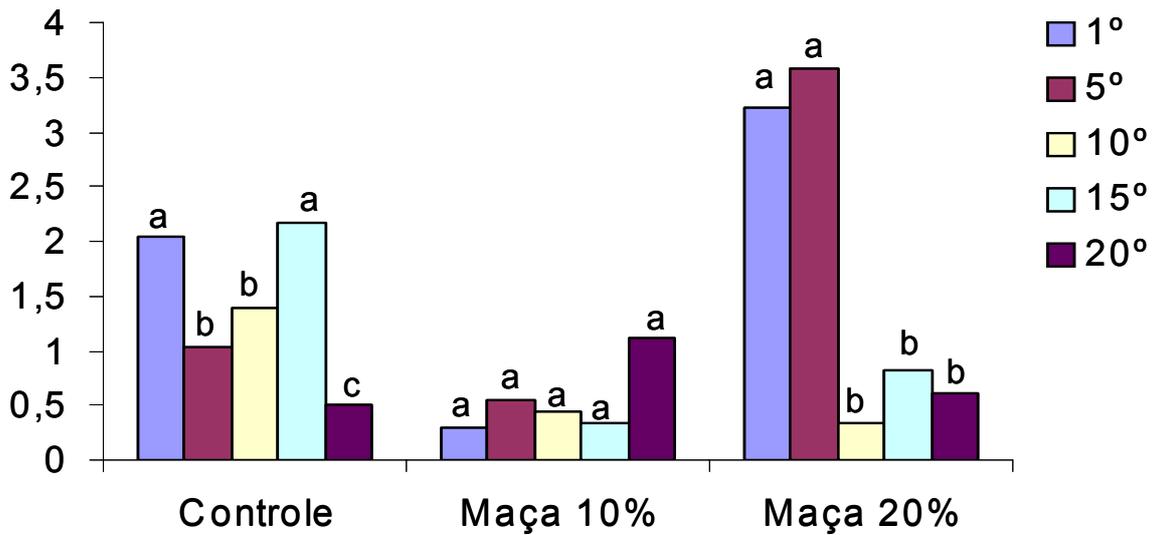
**Lipídios Totais:** no grupo controle os níveis lipídicos observados no primeiro dia de vida diminuíram e assim se mantiveram ao longo das outras idades estudadas. Este padrão mudou nas dietas com maçã, uma vez que observa-se uma queda nestes níveis somente aos dez dias de vida, e em idades mais avançadas ocorreram valores similares aos iniciais (Figura 9).



**Figura 9.** Comparação das medianas dos níveis de lipídios totais (mg/g) nas diferentes idades em fêmeas tratadas com maçã (letras iguais em cada dieta não apresentam diferenças significativas entre as idades).

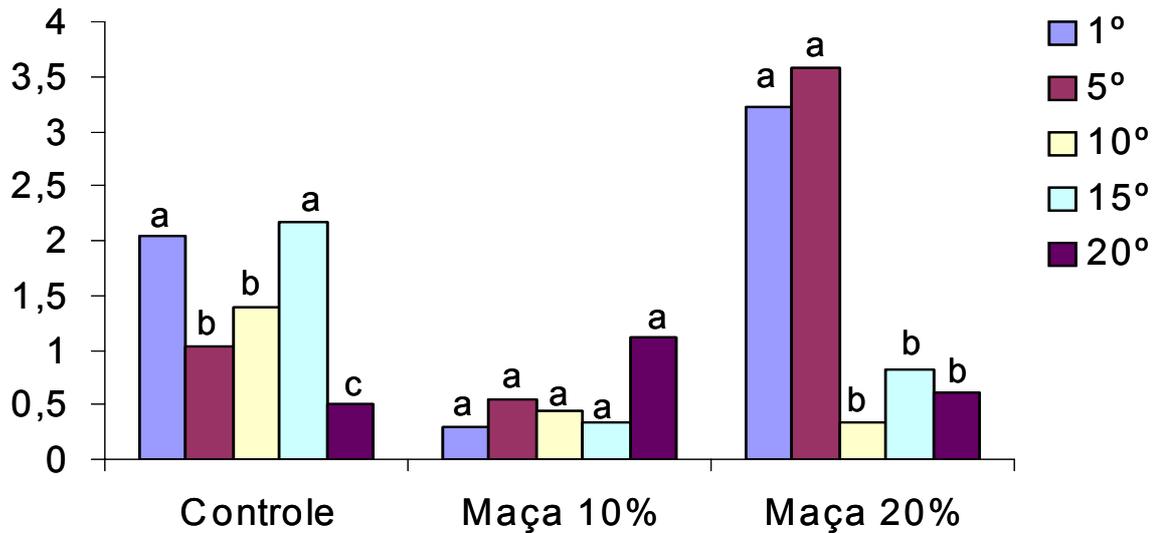
Uma tendência similar foi observada na dieta com maçã a 20% ainda que com vinte dias de idade os níveis lipídicos não tenham alcançado os mesmos valores que no início da vida .

**Triglicerídios:** nas fêmeas controle observamos no primeiro e no décimo dia níveis mais elevados de triglicerídios. Este padrão sofreu alterações segundo a concentração da maçã empregada. As moscas tratadas com 20% de maçã também apresentaram um pico de triglicerídeos no primeiro dia. Contudo , tais níveis se mantêm elevados até o quinto dia, ocorrendo, então, uma drástica diminuição nestes níveis a partir do 10° dia. Já, o tratamento com maçã 10% apresentou um padrão bem diferenciado dos grupos anteriormente descritos, não sendo observadas diferenças significativas nos níveis de triglicerídeos nas diferentes idades testadas (Figura 10).



**Figura 10.** Comparação das medianas dos níveis de triglicerídios (mg/g) nas diferentes idades em fêmeas tratadas com maçã (letras iguais em cada tratamento não apresentam diferenças significativas entre as idades).

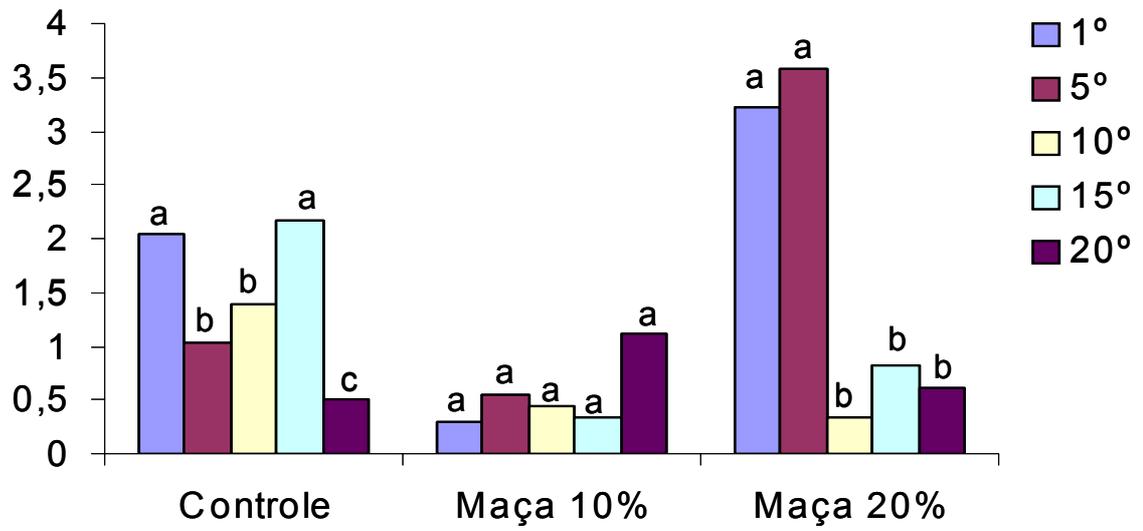
**Glicogênio:** não foi possível testar fêmeas com vinte dias de idade por escassez de amostras. Por tal motivo, na análise dos níveis de glicogênio esta idade foi excluída. Nas fêmeas controle, níveis significativamente mais elevados de glicogênio só foram observados no grupo com 20 dias de idade. Padrão de resposta mudou no grupo tratado com maçã a 10%, visto que níveis bastante elevados de glicogênio são observados só no primeiro e no quinto dia de vida, reduzindo-se de forma acentuada aos 15 dias. Já no grupo tratado com maçã 20%, os níveis de glicogênio passaram a ser similares em todas as idades testadas (Figura 11), contudo, mais elevados que aqueles observados em animais controle.



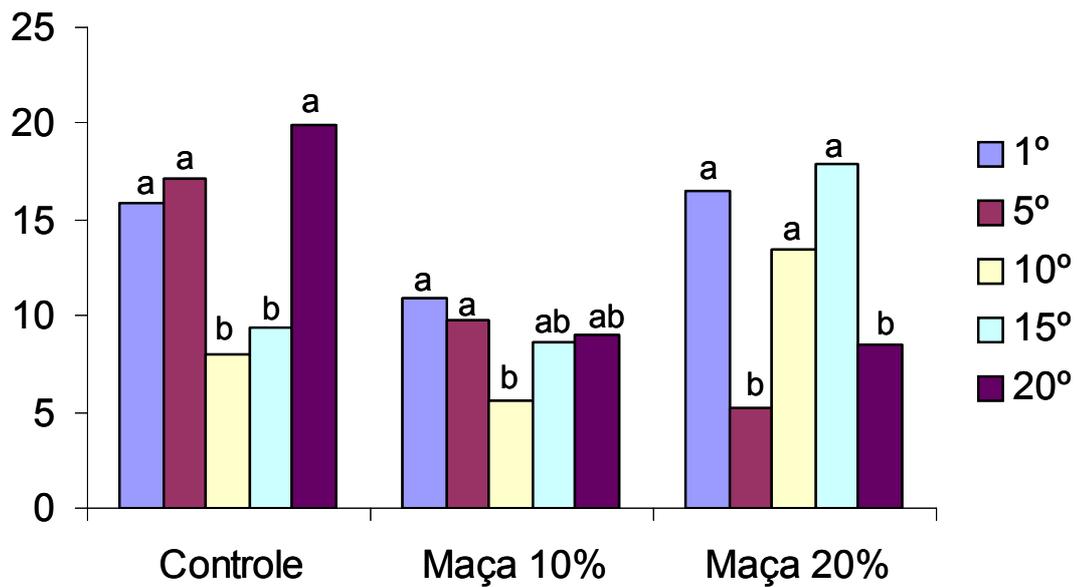
**Figura 11.** Comparação das medianas dos níveis de glicogênio (mg/g) nas diferentes idades em fêmeas tratadas com maçã (letras iguais em cada tratamento não apresentam diferenças significativas entre as idades).

**Proteínas:** verificamos um aumento significativo nos níveis de proteínas totais em fêmeas do grupo controle somente aos dez dias de idade. Este perfil de respostas mudou com os tratamentos, sendo que nas moscas tratadas com maçã 10% e 20% observamos aos cinco e vinte dias dois picos de aumento nos níveis de proteínas totais. (Figura 12).

**TBA:** no grupo de fêmeas controle foi observada uma queda significativa nos níveis de TBA entre os 10 e 15 dias. No grupo de moscas tratadas com maçã 10% tal queda ocorreu somente em moscas com dez dias. Já no tratamento com uma concentração de 20% de maçã observamos um perfil de respostas bastante diferencial, uma vez que foi verificada uma queda nos níveis de TBA já aos cinco dias de idade e, outra, aos vinte dias. (Figura 13).



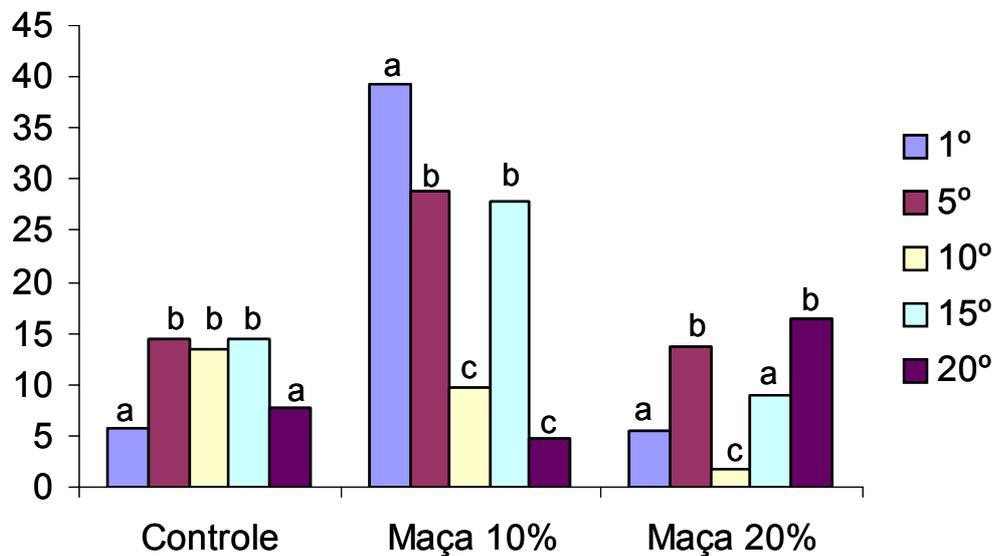
**Figura 12.** Comparação das medianas dos níveis proteínicas totais (mg/ml) nas diferentes idades em fêmeas tratadas com maçã (letras iguais em cada tratamento não apresentam diferenças significativas entre as idades).



**Figura 13.** Comparação das medianas dos níveis TBA (unid) nas diferentes idades em fêmeas tratadas com maçã (letras iguais em cada tratamento não apresentam diferenças significativas entre as idades).

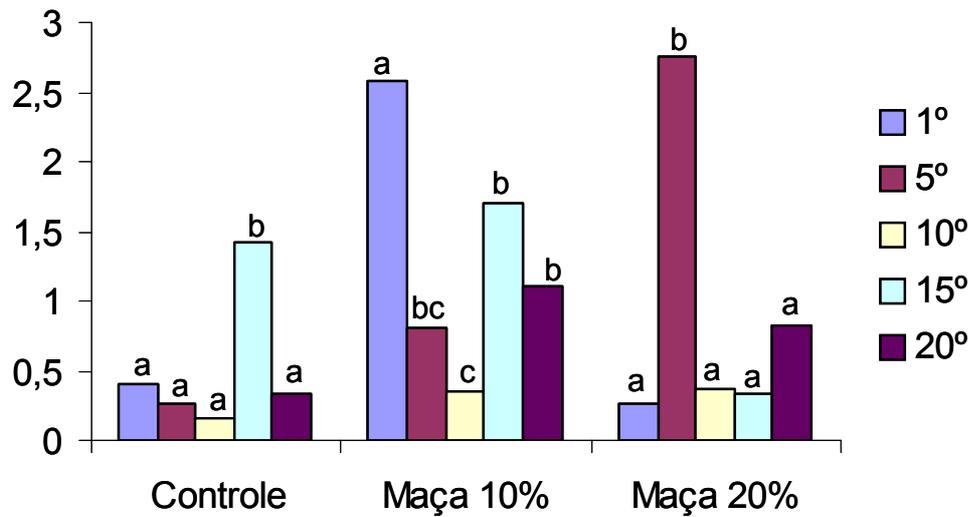
Nos machos as seguintes associações estatisticamente significativas foram observadas e são descritas abaixo.

**Lipídios:** os níveis lipídicos aumentaram significativamente entre 5 a 15 dias em relação aos níveis observados no primeiro dia e diminuem a valores semelhantes aos iniciais em moscas com 20 dias de idade. Padrão diferencial da resposta foi observado com os tratamentos, seguido de um aumento aos 15 dias, verificando-se uma queda significativa nas moscas com 10 dias de idade, tanto no tratamento com maçã 10% quanto com 20%; nos animais que receberam maçã 10% os níveis diminuiriam drasticamente aos 20 dias, fato não verificado nos animais que receberam a concentração de 20% de maçã. (Figura 14).



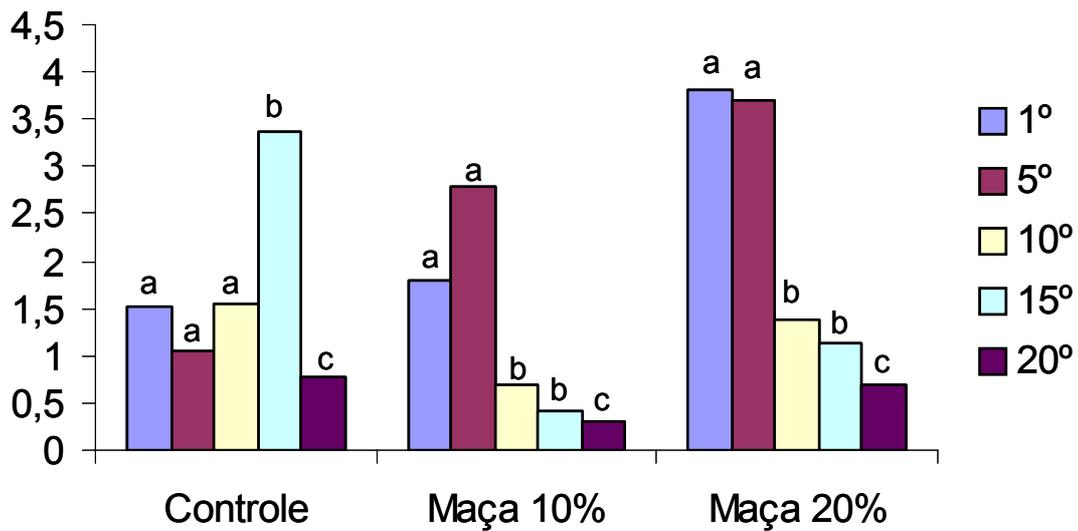
**Figura 14.** Comparação das medianas dos níveis lipídicos (mg/g) nas diferentes idades em machos tratados com maçã (letras iguais em cada tratamento não apresentam diferenças significativas entre as idades).

**Triglicerídios:** nos machos controle um aumento significativo nos triglicerídios foi detectado somente aos 15 dias de idade. Já no grupo que recebeu maçã a 10% observamos níveis elevados de triglicerídios já ao primeiro dia da vida adulta; uma diminuição aos 10 dias seguida de um aumento aos 15 e 20 dias. Nos machos que foram tratados com maçã 20% verificamos somente um aumento aos 5 dias de vida.(Figura 15).



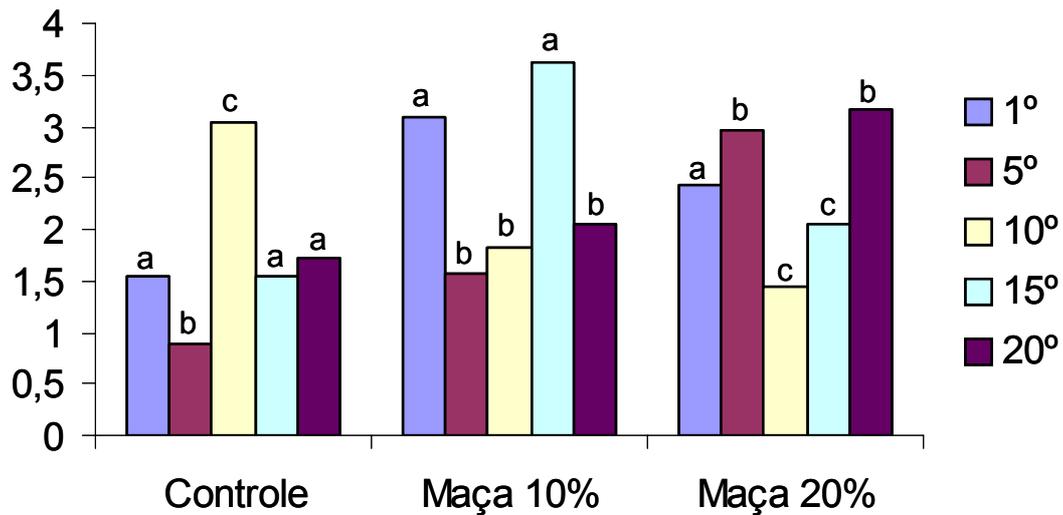
**Figura 15.** Comparação das medianas dos níveis de triglicerídios (mg/g) nas diferentes idades em machos tratados com maçã (letras iguais em cada tratamento não apresentam diferenças significativas entre as idades).

**Glicogênio:** um pico significativamente mais alto nos níveis de glicogênio foi observado no grupo de machos com 15 dias de idade. Já nas moscas tratadas com maçã a 10 e 20% este aumento da concentração de glicogênio foi verificado no 1 e 5 dias de vida, e após este período observamos uma diminuição intensa da concentração deste polissacarídeo. (Figura 16).



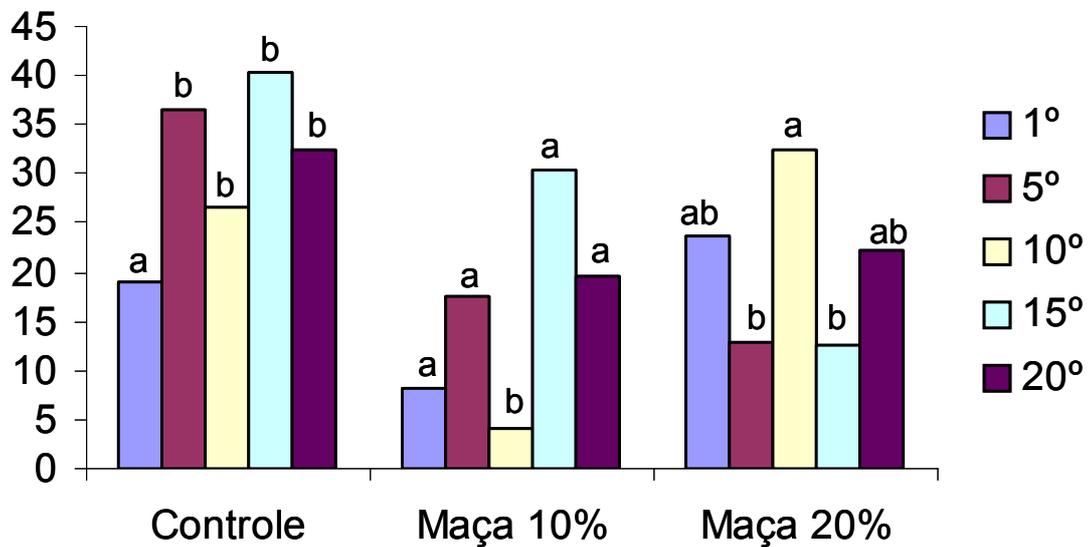
**Figura 16.** Comparação das medianas dos níveis de glicogênio (mg/g) nas diferentes idades em machos tratados com maçã (letras iguais em cada tratamento não apresentam diferenças significativas entre as idades).

**Proteínas:** no grupo controle o grupo etário que apresentou níveis significativamente maiores de proteínas foi o dos machos com dez dias de idade. Entretanto, os maiores níveis protéicos ocorreram em moscas com um e quinze dias no grupo tratado com maçã a 10% e nos animais de cinco a vinte dias no grupo tratado com maçã a 20% (Figura 17).



**Figura 17.** Comparação das medianas dos níveis de proteína (mg/ml) nas diferentes idades em machos tratados com maçã (letras iguais em cada tratamento não apresentam diferenças significativas entre as idades).

**TBA:** em machos controle os níveis de TBA aumentaram significativamente a partir dos cinco dias de idade mantendo-se elevados até o final do período de estudo. Em moscas tratadas com maçã a 10% os níveis se mantiveram uniformes com exceção dos animais com 10 dias de idade que apresentaram uma queda significativa nos níveis de TBA. Comparando a modulação dos níveis de TBA dos machos tratados com 20% em relação aos demais tratamentos pode-se dizer que tais níveis apresentaram uma maior variação verificando-se, pelo menos 2 picos de lipoperoxidação no primeiro dia de vida e um no décimo dia. (Figura 18).



**Figura 18.** Comparação das medianas dos níveis de TBA (unid?) nas diferentes idades em machos tratados com maçã (letras iguais em cada tratamento não apresentam diferenças significativas entre as idades.)

Uma análise adicional foi realizada comparando os valores quantitativos das variáveis investigadas nos diferentes tratamentos para cada um dos grupos etários investigados.

Os resultados observados nas fêmeas são apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Comparação entre as medianas das variáveis metabólicas investigadas em fêmeas tratadas com maçã em diferentes idades. Continua

Variáveis	Idades	Tratamentos	Percentis			
			25,00	50 (Mediana)		75,00
Lipídios	1º dia	controle	9,64	10,81	a	11,06
		tratamento 10%	3,99	5,20	b	8,81
		tratamento 20%	4,78	13,04	a	18,83
	5 dias	controle	4,66	5,45	a	5,69
		tratamento 10%	3,49	10,13	b	16,45
		tratamento 20%	9,11	12,35	b	15,60
	10 dias	controle	3,92	4,19	a	5,30
		tratamento 10%	2,08	2,30	a	2,69
		tratamento 20%	1,47	2,10	a	2,75
15 dias	controle	5,82	5,93	a	6,49	
	tratamento 10%	5,65	6,25	a	7,72	
	tratamento 20%	6,87	9,42	b	11,42	
20 dias	controle	2,40	2,41	a	2,57	
	tratamento 10%	6,40	7,25	b	8,19	
	tratamento 20%	4,71	6,05	b	10,68	
Triglicerídios	1º dia	controle	1,18	2,05	a	2,37
		tratamento 10%	0,21	0,30	b	0,37
		tratamento 20%	1,88	3,24	a	4,05
	5 dias	controle	0,63	1,05	a	1,13
		tratamento 10%	0,48	0,54	b	1,46
		tratamento 20%	1,80	3,59	c	5,92
	10 dias	controle	1,18	1,39	a	1,65
		tratamento 10%	0,29	0,45	b	0,58
		tratamento 20%	0,18	0,35	b	0,44

Continuação

Variáveis	Idades	Tratamentos	Percentis			
			25,00	50 (Mediana)	75,00	
	15 dias	Controle	2,15	2,17	a	2,35
		tratamento 10%	0,11	0,33	b	0,56
		tratamento 20%	0,51	0,82	b	1,38
	20 dias	controle	0,32	0,51	a	0,58
		tratamento 10%	0,98	1,13	b	1,13
		tratamento 20%	0,33	0,61	a	1,10
Glicogênio	1º dia	controle	0,37	0,39	a	0,42
		tratamento 10%	1,98	2,10	b	3,54
		tratamento 20%	0,03	1,90	a	3,77
	5 dias	controle	0,62	0,63	a	0,64
		tratamento 10%	2,85	3,16	b	3,54
		tratamento 20%	0,68	1,78	c	2,82
	10 dias	controle	0,45	0,45	a	0,45
		tratamento 10%	0,21	0,23	a	0,47
		tratamento 20%	0,78	1,39	b	2,04
	15 dias	controle	3,23	3,25	a	3,26
		tratamento 10%	1,19	1,74	b	2,36
		tratamento 20%	1,41	1,82	b	2,23
		tratamento 20%	na	Na		Na
Proteína	1º dia	controle	1,45	1,48	a	1,51
		tratamento 10%	0,80	0,84	b	0,96
		tratamento 20%	0,41	1,71	a	3,36
	5 dias	controle	1,12	1,36	a	1,63
		tratamento 10%	2,81	3,39	b	3,93
		tratamento 20%	3,48	3,65	b	4,07

## Conclusão

Variáveis	Idades	Tratamentos	Percentis			
			25,00	50 (Mediana)		75,00
	10 dias	controle	3,56	3,73	a	3,84
		tratamento 10%	1,15	1,41	b	1,45
		tratamento 20%	1,94	2,37	b	2,79
	15 dias	controle	1,62	2,03	a	2,07
		tratamento 10%	1,41	1,98	a	1,99
		tratamento 20%	1,27	2,68	b	4,24
	20 dias	controle	2,08	2,09	a	2,19
		tratamento 10%	3,41	3,45	b	3,54
		tratamento 20%	3,69	4,14	c	4,50
TBA	1º dia	controle	12,06	15,93	a	17,75
		tratamento 10%	8,09	10,93	b	17,79
		tratamento 20%	9,63	16,53	a	19,86
	5 dias	controle	11,74	17,14	a	21,81
		tratamento 10%	3,65	9,76	b	11,53
		tratamento 20%	4,71	5,27	c	6,74
	10 dias	controle	7,17	8,00	a	9,01
		tratamento 10%	4,40	5,58	b	6,64
		tratamento 20%	6,73	13,51	c	20,48
	15 dias	controle	8,19	9,44	a	17,10
		tratamento 10%	5,29	8,57	a	14,40
		tratamento 20%	5,96	17,94	b	21,27
	20 dias	controle	15,89	19,87	a	31,90
		tratamento 10%	6,48	8,96	b	9,89
		tratamento 20%	7,95	8,54	b	12,19

Letras iguais para cada idade não apresentam diferenças significativas  $p < 0,05$

Pelo teste não paramétrico de amostras independentes de Mann-Whitney.

**Lipídios:** observou-se que os níveis lipídicos logo após a emergência do imago foram altos nas fêmeas controle e assim se mantiveram nas tratadas com maçã a 20%. Entretanto, no tratamento com maçã a 10% estes valores foram significativamente menores indicando menor armazenamento energético durante a fase pupal. Com cinco dias os níveis lipídicos observados na controle diminuíram enquanto que nas moscas tratadas com maçã a 10% aumentaram, indicando uma inversão metabólica em relação ao primeiro dia nos valores encontrados. No caso das fêmeas tratadas com maçã a 20% mostraram valores dos níveis lipídicos similares àqueles do tratamento com maçã a 10% e, semelhantes aos observados no primeiro dia com este tratamento. Uma queda nos níveis lipídicos foi observada em todos os tratamentos a partir do 10 dia sendo no 20º dia mais acentuada na amostra controle.

**Triglicerídios:** no tratamento com maçã a 10% os níveis de triglicerídios, semelhante ao perfil observado para os lipídios foi significativamente menor do que o grupo controle e no grupo tratado com maçã a 20%. Um padrão difuso de variação nos níveis de triglicerídios, nas demais idades não permitiu reconhecer um perfil característico e relacionado a cada tratamento empregado.

**Glicogênio:** no grupo de moscas com um dia e cinco dias de idade ao contrário dos lipídios e triglicerídios os níveis de glicogênio foram significativamente maiores nas fêmeas tratadas com maçã a 10% em relação às controles e às tratadas a 20%. Uma reserva significativamente maior de glicogênio nas fêmeas controle foi observada somente nas moscas com 15 dias de idade.

**Proteínas:** similar ao comportamento dos lipídios e triglicerídios, os níveis de proteína no primeiro dia de vida foram significativamente menores nas fêmeas tratadas com maçã a 10%. Uma inversão ocorreu nas moscas de cinco dias, ocorrendo maiores níveis de proteína nas tratadas com 10% em relação às controle. Um padrão similar às fêmeas tratadas com 10% nos foi observado nas tratadas com 20%. A partir do décimo dia não foi possível reconhecer um padrão diferenciado nos níveis protéicos entre os tratamentos que indique relevância fisiológica.

**TBA:** os níveis de TBA foram estatisticamente menores no primeiro dia de vida das fêmeas tratadas com maçã a 10% em relação às controle e às tratadas com 20%. Este padrão persistiu nos cinco e nos dez dias de idade. Nos quinze e vinte dias os níveis de TBA passaram a ser significativamente menores nas moscas tratadas com maçã a 10% e 20% em relação às fêmeas controle.

Os resultados observados nos machos são descritos na Tabela 4.

**Lipídios:** ao contrário das fêmeas os machos de um dia tratados com maçã a 10% apresentaram altos níveis lipídicos em relação aos controle e aos tratados com 20% de maçã . Este padrão se manteve nos cinco dias e nos quinze dias. Isto porque, os machos controle aos dez dias de idade passaram a apresentar níveis lipídicos mais altos e similares ao dos machos tratados com 10% de maçã . Ao contrário do que foi observado nos animais tratados com maçã a 10%, o grupo tratado com maçã a 20% tendeu a apresentar valores lipídicos muito baixos na maioria das idades testadas aumentando somente no grupo de 20 dias de idade onde apresentou valores significativamente mais altos do que os demais tratamentos.

**Triglicerídios:** exceto para o primeiro dia onde machos tratados com maçã a 10% apresentaram valores de triglicerídios superiores aos demais tratamentos nas outras idades foi observada uma grande variação nos níveis desta variável que não permitiu estabelecer um padrão peculiar a cada tratamento.

**Glicogênio:** no primeiro dia machos tratados com maçã a 10% apresentaram valores similares de glicogênio aos controle. Entretanto, níveis significativamente mais altos deste polissacarídeo foram observados nos machos tratados com maçã a 20%. Nas moscas com cinco dias de idade também foram observados maiores níveis de glicogênio em machos tratados com 20% de maçã . Entretanto, os tratados com 10% de maçã também apresentaram maiores níveis do que os machos controle. Com dez, quinze e vinte dias, uma queda abrupta e significativa no glicogênio foi observada em machos tratados com 10% de maçã , em relação aos demais tratamentos. Os machos tratados com 20% continuaram a apresentar valores de glicogênio estatisticamente superiores em relação aos demais tratamentos. Somente com quinze dias é que os machos controles tiveram níveis de glicogênio superiores aos demais tratamentos.

**Proteínas:** diferenças significativas foram observadas em relação aos tratamentos nos diferentes grupos etários analisados. Porém não foi possível reconhecer um padrão distinto a um destes tratamentos.

**TBA:** nos grupos de um, cinco e dez dias os níveis de TBA dos machos tratados com maçã a 10% foram significativamente baixos. Porém, este perfil se inverteu no grupo de quinze dias, sendo observados níveis altos desta variável em relação aos

grupos controles e tratados com maçã a 20%. Apesar deste pico, o TBA voltou a cair nos machos tratados com 10% de maçã em relação aos controle, sendo similares aos machos tratados com maçã a 20%.

Uma análise multivariada complementar foi realizada para verificar que variáveis seriam diretamente influenciadas pelos tratamentos. Para tanto foram primeiramente comparadas as moscas controle com as tratadas com maçã a 10% e posteriormente as controle com as tratadas com maçã a 20%.

Os resultados mostraram que independente de sexo e da idade o tratamento com maçã a 10% influenciou significativamente os níveis de lipídios( $\chi^2=7,93$ ,  $p=0,005$ ), glicogênio( $\chi^2=5,490$ ,  $p=0,019$ ). e TBA ( $\chi^2=10,58$   $p=0,001$ ).

Já, o tratamento com maçã a 20% influenciou somente os níveis de proteína( $\chi^2=5,747$ ,  $p=0,017$ ), independente do sexo e da idade.

Portanto, a partir das análises univariadas e da análise multivariada os resultados obtidos indicam que o tratamento com maçã a 10% tem influência sobre variáveis fisiológicas relacionadas com o metabolismo energético e com o dano oxidativo.

**Tabela 4.** Comparação entre as medianas das variáveis metabólicas investigadas em machos tratados com maçã em diferentes idades.

Continua

Variáveis	Idades	Tratamentos	Percentis			
			25,00	50,00		75,00
Lipídios	1º dia	controle	5,74	5,83	a	6,41
		tratamento 10%	31,84	39,34	b	49,62
		tratamento 20%	4,99	5,44	a	5,46
	5 dias	controle	13,81	14,49	a	15,86
		tratamento 10%	10,65	28,78	b	48,73
		tratamento 20%	11,42	13,65	a	16,76
	10 dias	controle	12,07	13,50	a	13,94
		tratamento 10%	3,08	9,61	b	16,95
		tratamento 20%	1,27	1,83	c	2,26
	15 dias	controle	13,51	14,30	a	14,30
		tratamento 10%	19,33	27,86	b	37,66
		tratamento 20%	7,75	8,93	c	9,44
20 dias	controle	7,38	7,64	a	9,31	
	tratamento 10%	4,03	4,83	b	5,45	
	tratamento 20%	10,28	16,36	c	20,58	
Triglicerídios	1º dia	controle	0,34	0,42	a	1,20
		tratamento 10%	2,01	2,58	b	4,02
		tratamento 20%	0,22	0,27	c	0,32
	5 dias	controle	0,27	0,27	a	0,29
		tratamento 10%	0,54	0,82	b	1,27
		tratamento 20%	1,43	2,76	c	3,78
	10 dias	controle	0,12	0,17	a	0,40

Continuação

Variáveis	Idades	Tratamentos	Percentis			
			25,00	50,00	75,00	
		tratamento 10%	0,18	0,36	b	0,75
		tratamento 20%	0,36	0,37	b	0,42
	15 dias	controle	1,38	1,42	a	1,62
		tratamento 10%	0,60	1,71	a	2,41
		tratamento 20%	0,13	0,33	b	0,74
	20 dias	controle	0,27	0,33	a	0,72
		tratamento 10%	0,75	1,11	b	1,57
		tratamento 20%	0,82	0,84	a	0,99
Glicogênio	1º dia	controle	1,44	1,51	a	1,51
		tratamento 10%	1,01	1,81	a	2,66
		tratamento 20%	3,77	3,82	b	3,92
	5 dias	controle	0,97	1,05	a	1,05
		tratamento 10%	2,35	2,80	b	3,41
		tratamento 20%	0,65	3,70	c	7,38
	10 dias	controle	1,54	1,54	a	1,57
		tratamento 10%	0,30	0,69	b	1,05
		tratamento 20%	1,03	1,37	a	1,68
	15 dias	controle	3,05	3,37	a	3,50
		tratamento 10%	0,36	0,42	b	0,47
		tratamento 20%	1,11	1,15	c	1,19
	20 dias	controle	0,74	0,76	a	0,76
		tratamento 10%	0,17	0,30	b	0,37
		tratamento 20%	0,52	0,71	c	0,73
Proteína	1º dia	controle	1,49	1,54	a	1,59
		tratamento 10%	2,16	3,08	b	3,78

Continuação

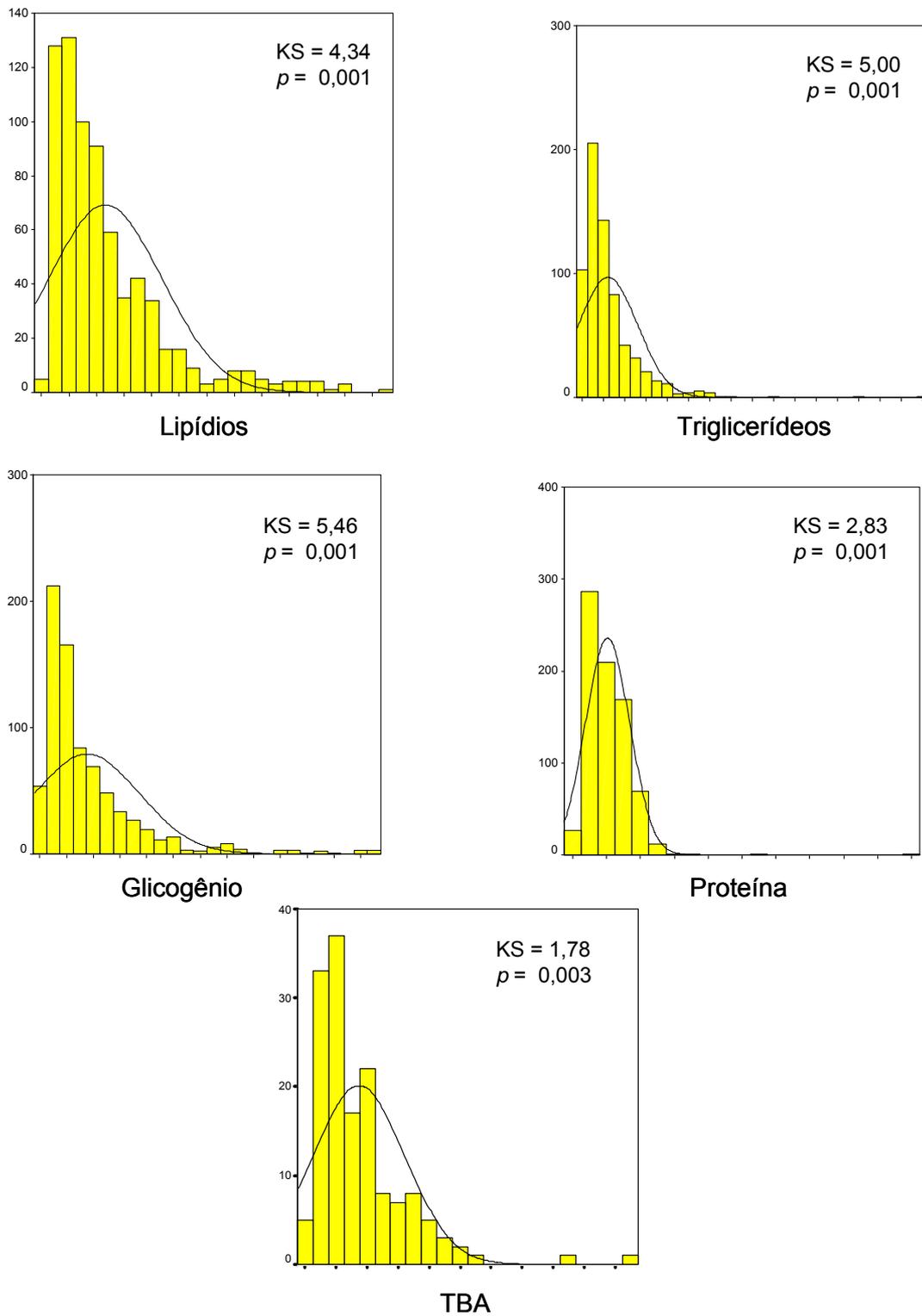
Variáveis	Idades	Tratamentos	Percentis			
			25,00	50,00	75,00	
		tratamento 20%	2,37	2,44	b	2,66
	5 dias	controle	0,88	0,89	a	0,92
		tratamento 10%	0,63	1,59	b	2,03
		tratamento 20%	2,79	2,96	c	3,11
	10 dias	controle	2,95	3,03	a	3,10
		tratamento 10%	0,61	1,82	b	3,13
		tratamento 20%	0,61	1,45	b	2,27
	15 dias	controle	1,55	1,55	a	1,61
		tratamento 10%	3,43	3,62	b	3,78
		tratamento 20%	0,82	2,06	a	3,69
	20 dias	controle	1,60	1,72	a	3,77
		tratamento 10%	0,65	2,06	a	3,43
		tratamento 20%	3,07	3,17	a	3,32
TBA	1º dia	controle	13,83	19,03	a	19,58
		tratamento 10%	5,09	8,26	b	10,54
		tratamento 20%	15,40	23,75	c	25,82
	5 dias	controle	33,84	36,60	a	42,10
		tratamento 10%	7,35	17,58	b	32,61
		tratamento 20%	9,49	12,81	b	14,90
	10 dias	controle	23,00	26,65	a	35,58
		tratamento 10%	1,61	3,97	b	8,63
		tratamento 20%	20,48	32,49	c	54,00
	15 dias	controle	38,65	40,26	a	45,26
		tratamento 10%	12,71	30,53	b	45,43
		tratamento 20%	9,91	12,43	c	16,50

## Conclusão

Variáveis	Idades	Tratamentos	Percentis			
			25,00	50,00	75,00	
20 dias		controle	31,46	32,42	a	35,19
		tratamento 10%	13,44	19,63	b	22,90
		tratamento 20%	12,95	22,15	b	34,63

Letras iguais para cada idade não apresentam diferenças significativas  $p < 0,05$

Pelo teste não paramétrico de amostras independentes de Mann-Whitney.



**Figura 19.** Distribuição dos valores observados nas variáveis metabólicas investigadas em *Drosophila melanogaster*. KS= valor do teste de *Kolmogorov-Smirnof* para normalidade. Significância < 0,05 indica distribuição não normal.

---

*DISCUSSÃO*

## 6 DISCUSSÃO

O presente estudo descreveu o efeito da maçã Fuji *in natura* e desidratada no tempo de vida (longevidade/mortalidade) e em indicadores do metabolismo e fisiologia de *Drosophila melanogaster*. Foi observada uma associação positiva e significativa entre a expectativa de vida e os parâmetros metabólicos e fisiológicos analisados. A revisão da literatura, até o presente momento, feita através dos bancos eletrônicos MEDLINE/PUBMED, EMBASE Geriatrics & Gerontology e LILACS (Literatura Latinoamericana e do Caribe em Ciências da Saúde), sugere que este seja o primeiro estudo brasileiro investigando o potencial antioxidante natural de um alimento funcional neste organismo modelo.

Para a análise do efeito da maçã Fuji *in natura* e desidratada no tempo de vida e no metabolismo e fisiologia de *Drosophila melanogaster* foram realizadas comparações entre as diferentes apresentações do fruto (desidratado e *in natura*), diferentes concentrações (10% e 20%) para ambas as formas de preparo da dieta usada no tratamento acrescido do meio padrão, bem como uma população controle somente com meio padrão (sem maçã). Esta metodologia de análise permitiu não só investigar a influência da dieta no envelhecimento, mas também uma análise dos padrões metabólicos e fisiológicos de *D. melanogaster*.

Para tais associações, o estudo prospectivo e de intervenção foi feito desde o período larval até a morte do último indivíduo em estudo. Além desta associação do

alimento funcional, tempo de vida e padrões metabólicos e fisiológicos, o presente estudo buscou dimensionar o dano oxidativo cujo processo está presente nas morbidades mais prevalentes com o processo de envelhecimento.

Como comentado anteriormente, o conjunto dos resultados obtidos no presente estudo mostrou que a dieta influenciou de modo diferencial os padrões demográficos (longevidade e expectativa de vida) assim como os padrões metabólicos e fisiológicos de machos e fêmeas desenvolvidos durante a fase larval e adulta nas diferentes dietas corroborando com estudos que envolvem os alimentos funcionais.<sup>133, 134</sup>

A partir desta premissa geral, serão discutidos os principais resultados encontrados.

### **6.1 Efeito do tratamento da maçã na longevidade/mortalidade**

Dentre os tratamentos utilizados, observou-se que independente da forma de preparo e da apresentação da dieta, a concentração de 10% utilizada foi significativamente mais eficaz em relação ao tempo de vida para ambos os sexos, apesar de ter havido um incremento de 21 dias na expectativa de vida dos machos em relação às fêmeas que apresentaram um incremento de apenas 11 dias em relação ao controle.

Segundo a revisão da literatura pode-se dizer que tem sido realizado um número relativamente pequeno de estudos sobre o efeito de frutas e compostos antioxidantes sobre a longevidade e o envelhecimento de *Drosophila melanogaster*. Um destes estudos envolveu a análise da influência da vitamina E no tempo de vida deste modelo experimental. O aumento da expectativa de vida através da ação da

vitamina E tem sido relatada por estudos de Miquel et al.<sup>135</sup> e de Driver e Georgeou<sup>136</sup>. No caso, estes últimos autores encontraram efeitos variáveis da vitamina E sobre a longevidade de *D. melanogaster*. Isto porque a uma concentração de 20 µg/ml o tempo de vida da mosca das frutas aumentou cerca de 16%. Entretanto, doses inferiores ou superiores não apresentaram efeitos sobre o tempo de vida da mosca. Estes resultados corroboram com os descritos neste estudo que mostraram um efeito mais contundente do tratamento de maçã a 10% do que o tratamento a 20% ou o não tratamento. Os autores que investigaram a vitamina E inferem que ocorrem ações antagonistas da vitamina E, conforme a concentração, onde o balanço de efeitos tóxicos e benéficos determina o efeito sobre o tempo de vida da mosca. Uma vez que a teoria do efeito dos radicais livres sobre o envelhecimento tem sido amplamente testada e confirmada por dados experimentais, esta variação de resultados conforme a concentração do composto medido indica também que é a manutenção do balanço oxidativo (produção de radicais livres equilibrada à produção de antioxidantes) o processo chave do envelhecimento. Qualquer desbalanço maior pode levar ao desencadeamento de processos associados ao envelhecimento.<sup>137, 138</sup>

Uma vez que, o presente estudo não utilizou um composto antioxidante, mas sim um alimento funcional que contém compostos bioativos que conferem o potencial antioxidante ao alimento, os resultados indicam que existem fatores intrínsecos, além das propriedades nutricionais básicas, que estariam relacionados com um efeito protetor e promotor de saúde refletindo num aumento da expectativa de vida. Segundo Tsao e colaboradores<sup>139</sup>:

“(…) A percepção geral que a maçã é um fruto bom para a saúde tem encorajado muitos pesquisadores a procurar o “ingrediente

mágico” desta fruta. Isto porque estudos epidemiológicos recentes têm mostrado uma correlação inversa entre o consumo de maçã e produtos relacionados a muitas doenças crônico-degenerativas humanas. As associações mais consideradas são aquelas que apontam para a associação da ingestão da maçã com a diminuição de riscos cardiovasculares, disfunções pulmonares e diversos tipos de neoplasias (câncer de mama, próstata, cólon e pulmão). O impacto biológico da maçã, similar a muitas outras frutas, pode ser devido muito mais à presença de um conjunto de compostos antioxidantes tais como os polifenóis do que a de vitaminas como a vitamina E, C e beta-caroteno. Por exemplo, na maçã a vitamina C explica somente 0,4% da atividade antioxidante total. No caso, cinco principais grupos de polifenóis são encontrados em diversos tipos de cultivares da maçã: ácidos hidroxicinâmicos, procianinas, antocianinas, flavonóides e dihidrocalconas. (...) <sup>139</sup>

Por este motivo diversos autores como é o caso de Pearson et al. <sup>120</sup> sugerem que a atividade antioxidante da maçã não é devido a uma classe específica de compostos presentes nesta fruta. Possíveis efeitos sinérgicos e antagônicos dos compostos fenólicos estão misturados na fruta e devem ser considerados quando se investiga a ação da mesma sobre a longevidade e o metabolismo de organismos complexos.

Nos estudos biogerontológicos desenvolvidos em modelos experimentais, sabe-se que a dieta tem um papel importante nos padrões de fertilidade e mortalidade. Entretanto, a maioria das investigações realizadas estão centradas no

efeito da restrição calórica uma vez que esta estende o tempo de vida e diminui a taxa de deterioração fisiológica tanto em roedores como em *Drosophila*. Recentemente, para tentar explicar a causa do retardo do envelhecimento pela restrição calórica, Butov et al.<sup>140</sup> postularam um modelo de envelhecimento de radical livre via “proteína e energia” utilizando a mosca do mediterrâneo *Ceratitis capitata*. Este modelo foi construído a partir de simulações matemáticas de processos fisiológicos individuais envolvendo restrição calórica protéica. A teoria do radical livre para explicar o envelhecimento foi utilizada como base para a construção do modelo. Os resultados obtidos apontaram para uma possível ação dos radicais livres sobre a taxa de mortalidade e de fertilidade das moscas.

Caso o modelo esteja correto, os resultados aqui obtidos apontam que outras modulações dietéticas que não só a restrição calórica poderiam alterar a mortalidade e a fertilidade, incluindo o efeito de alimentos ricos em compostos antioxidantes, como é o caso da maçã . Como estudos envolvendo o efeito de frutas em geral na mortalidade e fertilidade de modelos experimentais ainda são muito incipientes, sugere-se que estudos complementares sejam realizados para que tal hipótese seja testada.

## 6.2 Efeito da maçã nas variáveis metabólicas investigadas

Quanto à modulação das variáveis metabólicas que atuam na fisiologia da mosca-da-fruta *D. melanogaster*, observou-se que esta foi diferencial em relação aos parâmetros metabólicos utilizados e aos sexos em cada dieta analisada.

A seguir, será feita uma abordagem individual para cada parâmetro metabólico analisado correlacionando com o comportamento fisiológico e a expectativa de vida em ambos os sexos.

Quanto aos níveis de lipídios observados, verificou-se que nas fêmeas nos primeiros cinco dias de vida estes níveis são elevados e influenciados pelos tratamentos com maçã. Quando estas foram alimentadas com maçã, independente da concentração, os níveis de lipídios sofreram um aumento significativo em relação ao grupo controle. Em relação aos machos, verificou-se um aumento substancial e significativo entre o quinto e décimo quinto dias em relação aos níveis observados no primeiro dia, tendo havido uma influência direta proveniente dos tratamentos com maçã durante todo o período ontogenético dos indivíduos tratados; nos vinte dias observou-se uma queda drástica nos parâmetros lipídicos nos indivíduos com tratamento de maçã a 10% independente da forma de apresentação da dieta, devendo-se ao fato das reservas terem começado a ser gastas para atividades variadas. Para os insetos em geral, as reservas lipídicas são importantes para as primeiras atividades de vôo, corte e reprodução, sendo estas reservas oriundas da alimentação larval. Como no presente estudo, os indivíduos se desenvolveram desde o período larval nas diferentes dietas, houve uma influência significativa da mesma em relação aos níveis lipídicos nos primeiros dias de vida dos mesmos,

sendo também observada através das expectativas de vida das moscas tratadas com maçã com relação às controles. Portanto, estas reservas lipídicas estariam sendo utilizadas como substrato para a manutenção da homeostasia corporal e energia para a sobrevivência das fêmeas, já que as mesmas necessitam de energia para a reprodução. Investigações publicadas anteriormente em *D. melanogaster* selecionadas ou para fertilidade tardia ou para resistência a *starvation* (restrição calórica) também mostraram aumento correlacionado com compostos metabólicos, incluindo o conteúdo lipídico.<sup>141</sup> Um estudo mais recente feito por Borash e Ho<sup>142</sup> investigou o efeito de populações de *D. melanogaster* criadas em condições de alta densidade populacional durante múltiplas gerações, também mostrou aumento nas reservas lipídicas. Uma vez que tanto a restrição calórica quanto a criação de moscas em altas densidades, aumentam o tempo de vida de *D. melanogaster*, os resultados aqui obtidos são compatíveis com os descritos anteriormente e indicam efeito da maçã no armazenamento lipídico das moscas, o que é favorável ao alongamento do tempo de vida. É interessante comentar que a relação entre conteúdo lipídico e homeostasia corporal é diferenciada entre invertebrados e vertebrados (incluindo o ser humano) uma vez que em invertebrados o armazenamento de gorduras está relacionado além de reserva energética com a manutenção da termorregulação visto serem estes animais pecilotérmicos.

Quanto aos níveis de triglicerídios, nas fêmeas desenvolvidas em maçã 10%, independente da forma de apresentação e preparo da dieta, observou-se uma queda significativa destes em todas as idades analisadas. Estes dados demonstram uma relação íntima entre os baixos níveis de triglicerídios e o aumento da expectativa de vida observada nas fêmeas mantidas nesta dieta com relação ao grupo controle. Quanto aos níveis de triglicerídios para os machos, aqueles que receberam

tratamento com maçã a 10% tiveram níveis elevados de triglicerídios já no primeiro dia de vida adulta, diminuição aos 10 dias seguida de um aumento aos 15 e 20 dias. Para os machos tratados com maçã a 20% verificou-se que o aumento ocorreu somente aos cinco dias de vida mostrando que possivelmente para uma concentração maior do tratamento as respostas obtidas não contemplaram positivamente determinados padrões metabólicos e fisiológicos. Infelizmente não foram encontrados estudos investigando correlações entre os níveis de triglicerídios e longevidade de modelos experimentais. Muito possivelmente isto ocorra porque esta variável esteja incluída na avaliação dos lipídios totais produzidos. Apesar desta relativa falta de estudos para comparar os resultados aqui obtidos, sugere-se que investigações adicionais sejam realizadas uma vez que parece que não são os triglicerídios, mas sim outras classes de lipídios que são a fonte energética armazenada pelas moscas e que estão associadas com a longevidade das mesmas.

144, 143

Para os níveis de glicogênio, nas fêmeas, observou-se que este parâmetro metabólico conferiu uma reserva de energia (carboidratos) que é utilizada nos primeiros dias de vida, onde foi observado um incremento nos níveis deste polissacarídeo somente aos 20 dias no grupo controle. Contudo, este padrão sofreu alterações quando se observou as moscas alimentadas com maçã 10% e 20%. Animais que receberam uma dieta com maçã 10% apresentaram um incremento para este polissacarídeo significativamente mais alta nos primeiros dias de vida das fêmeas, e isto influenciou a expectativa de vida das mesmas. Em relação aos machos, observou-se que o pico mais alto de reserva deste polissacarídeo aconteceu no primeiro e quinto dia de vida para os tratamentos com maçã nas concentrações de 10 e 20%; após este período houve uma diminuição intensa da

concentração de triglicerídios. Tais fatores sugerem, portanto, que ocorreu uma alteração na modulação das reservas de glicogênio nestes indivíduos durante a fase larval, fazendo com que os mesmos apresentassem, além de reservas lipídicas, também reservas de glicogênio favorecendo um maior tempo de vida, ou seja, influenciando na performance e sobrevivência do adulto. Uma das teorias evolutivas da longevidade preconiza que o tempo de vida é dependente da habilidade de resistir a todo o tipo de estresse ambiental. Um estudo feito com populações de *D. melanogaster* selecionadas para tempo de vida aumentado e submetidas a baixas temperaturas mostrou que as moscas longevas possuem uma maior reserva de glicogênio, que está associada à produção de glicerol, que auxilia a mosca a resistir as baixas temperaturas.<sup>144</sup> Por tal motivo, além do possível papel do glicogênio na função muscular relacionada com vôo, cópula e oviposição, a maior quantidade acumulada de glicogênio poderia auxiliar as moscas a sobreviver em ambientes hostis.

Um estudo teórico que investigou a regulação de genes da longevidade sugeriu que existem genes da longevidade associados à regulação de várias proteínas incluindo superóxido dismutases, catalase, proteínas de choque-térmico e serinas treoninas quinases. A função conservada dos genes da longevidade é também corroborada pelo papel de genes homólogos presentes nas leveduras e no verme nematodo *C. Elegans* que aumentam a proteção contra dano oxidativo e outras formas de estresse. Segundo Longo e Finch<sup>145</sup> genes conservados que podem regular a longevidade também são observados em *Drosophila melanogaster*. Mutações que diminuem a atividade da rota similar insulina/IGF-I aumentam a expressão de enzimas como a superóxido dismutase e o armazenamento de nutrientes além de aumentar a longevidade.<sup>146</sup> A similaridade destas rotas

metabólicas sugere que os genes associados à regulação da longevidade evoluíram a partir de ancestrais comuns.<sup>145, 146</sup>

Quanto aos níveis de proteínas totais, observou-se alteração nos picos das mesmas influenciada pela dieta. Nas fêmeas controles, o maior pico de proteína ocorreu aos 10 dias de idade, correspondendo ao momento de maior postura de ovos (dados não mostrados). Em relação aos machos, observou-se os maiores níveis protéicos ao primeiro e décimo dias de idade no grupo tratado com maçã a 10%; para o grupo tratado com maçã a 20% observou-se os picos aumentados de reserva protéica do quinto ao vigésimo dia, variabilidade nas quotas de reserva que pode ser compreendida se observada a sustentação das reservas protéicas que a espécie lança mão no pico reprodutivo (dados não analisados no presente estudo). Para os dípteros, as proteínas são fontes ricas de aminoácidos para a produção de oócitos, mRNAs durante a fase embrionária e, posteriormente, estas proteínas são transferidas para os ovos através de um processo denominado vitelogênese.<sup>147</sup> Este padrão sofreu alterações significativas quando as fêmeas foram desenvolvidas em dieta com maçã 10 e 20%, onde os picos de proteínas totais ocorreram com cinco e 20 dias de idade. Portanto, observou-se uma mudança nos níveis de proteínas em relação à idade devendo estar influenciando o comportamento reprodutivo, sugerindo com isto, a análise dos padrões reprodutivos frente aos tratamentos, já que a reprodução está diretamente relacionada com a longevidade do adulto.<sup>148</sup>

Considerando o conjunto dos resultados obtidos, sugere-se que a maçã possui efeito sobre variáveis metabólicas associadas a longevidade como é o caso dos níveis de lipídios, glicogênio e proteína.

Entretanto, em termos metabólicos pode-se dizer que o relacionamento entre a expressão gênica e a regulação da longevidade ainda é pouco compreendido. Estudos prévios investigando a ocorrência de mudanças tecido-específicas utilizando técnicas moleculares avançadas como o microarray mostraram que ocorrem mudanças na expressão gênica dependente da idade e que este processo é regulado até a fase final da vida. Um estudo feito por Seroude utilizando *Drosophila melanogaster* como modelo experimental mostrou que cerca de 80% dos genes investigados apresentaram mudanças transcricionais com a idade. Em alguns casos tais mudanças foram correlacionadas com diversas condições de criação sugerindo que podem existir marcadores fisiológicos do envelhecimento. No caso, tais marcadores incluíam genes associados ao sistema imunológico, a organização de microtúbulos e a função muscular.<sup>149</sup>

Uma vez que aqui não foi investigado o efeito do tratamento da maçã sobre a expressão gênica, mas sim sobre parâmetros fisiológicos, sugere-se que estudos futuros incluam esta abordagem para se verificar em que rotas metabólicas adicionais a maçã poderia estar atuando.

### **6.3 Associação entre tratamento com maçã e indicadores do estresse oxidativo**

Quanto aos níveis do produto ácido tiobarbitúrico (TBA), nas fêmeas mantidas na dieta com maçã 10%, observou-se os menores níveis, indicando que ocorreu uma menor taxa de dano oxidativo nas mesmas com relação ao grupo controle e com maçã 20%. Em relação aos machos mantidos sob o mesmo tratamento de maçã a 10%, observou-se níveis significativamente baixos nos grupos de um, cinco

e dez dias. Entretanto, este perfil se inverteu no grupo de quinze dias, sendo observados níveis altos desta variável em relação aos grupos controles e aos tratados com maçã a 20%. Portanto, pode-se dizer que ocorreu uma mudança significativa nas taxas de dano oxidativo influenciada pela dieta com maçã, onde a concentração de 10% conferiu maior proteção aos tecidos corporais das moscas. Muitos estudos têm demonstrado que a taxa de dano oxidativo influencia na longevidade dos organismos e a dieta é um dos principais fatores que atua e regula estas taxas.<sup>146, 150</sup> A maçã contém substâncias bioativas com natureza antioxidante, e justamente estas substâncias poderiam estar agindo e conferindo uma maior sobrevivência às fêmeas, como observado através do incremento do tempo de vida encontrado nas mesmas.

Trabalhos que investigam o efeito de substâncias isoladas antioxidantes em diferentes modelos animais têm demonstrado que a concentração elevada de algumas destas substâncias não confere aumento da longevidade nestes organismos, apesar de influenciar em diferentes rotas metabólicas e até mesmo ativação de genes envolvidos em mecanismos de reparo de danos celulares.<sup>151</sup>

Estes dados apontam a maçã como um alimento com grande potencial antioxidante, com a modulação dos níveis de lipídios totais, triglicerídios, glicogênio e proteínas totais, juntamente com um aumento na expectativa de vida. Desta forma, foi observada uma maior longevidade nas moscas tratadas com maçã.

Atualmente tem sido de grande interesse científico estudos relacionados com o envelhecimento e o impacto que este processo causa. Segundo Da Cruz et al.,<sup>152</sup> a complexidade de eventos associados ao envelhecimento e às doenças crônico-degenerativas tem levado a dificuldades na reprodução de estudos de associação entre doenças multifatoriais associadas ao envelhecimento em seres humanos.

Após a diferenciação celular, o crescimento corporal e o período de maturação reprodutiva, o envelhecimento e a senescência são palavras que podem ser usadas para caracterizar uma série de eventos ou fenômenos que afetam entidades biológicas desde o nível molecular até o populacional, determinando uma maior ou menor longevidade.

Estudos genéticos com *Drosophila melanogaster* mostraram que existe uma correlação inversa bastante clara entre os níveis de dano oxidativo e os níveis de defesa antioxidante.<sup>153</sup> Animais de longevidade aumentada vivem mais devido a um retardo no envelhecimento. Este retardo seria devido à manifestação, nos animais geneticamente mais longevos, de uma fase protetora caracterizada por altos níveis de SOD citoplasmática e mitocondrial e baixos níveis de oxidação, nos primeiros dias de vida adulta.<sup>154, 155</sup> Esta relação inversa entre o dano oxidativo e defesas antioxidantes ao longo da vida não se restringe somente às moscas, podendo ser evidenciada em outros estudos feitos com gerbo ou rato cangurus.<sup>153, 156</sup>

Em nível bioquímico, espécies ativas de oxigênio (EAOS) ou radicais livres são continuamente produzidas nas células vivas como subprodutos do metabolismo normal, durante o metabolismo de xenobióticos e por radiação. Esta produção de radicais livres ocorre normalmente como resultado da degradação oxidativa dos alimentos, fornecendo um aporte contínuo de energia livre para a manutenção das funções metabólicas vitais para todos os seres vivos. A condição de estresse oxidativo pode ser induzida por uma dieta desregrada com produção desenfreada de radicais livres (ânions superóxido, peróxido de hidrogênio e outras espécies reativas de oxigênio) e ação desordenada destes em moléculas orgânicas essenciais como proteínas, carboidratos, lipídios e DNA, levando a peroxidação de lipídios, modificação de proteínas e mutação no DNA mitocondrial. Esse dano, se não

prevenido e/ou reparado, iria rapidamente comprometer a integridade da célula.<sup>157</sup> Deste modo, existem correlações substanciais tanto em insetos como em mamíferos demonstrando que radicais livres de oxigênio são agentes causais no processo do envelhecimento. Estudos realizados em *Drosophila melanogaster* mostraram que moscas que super expressam SOD, ou apresentam uma SOD potencializada pela CAT (catalase), exibem uma resistência aumentada ao estresse oxidativo, mostrando um dano oxidativo significativamente menor em proteínas e um alongamento no tempo de vida. Isto sugere que a atividade e a capacidade dos sistemas antioxidantes dos tecidos celulares declinariam com a idade, levando a uma perda gradual do balanço pró-oxidante/anti-oxidante e acúmulo do dano oxidativo no processo do envelhecimento.

A captura de elétrons pelas EAOS, como no caso da oxidação de NADPH ao estado de NADP, impede que os mesmos possam ser utilizados em diversas tarefas de manutenção, tais como defesa antioxidante e processos de biossíntese, entre os quais a lipogênese. Este último efeito, em particular, tem se revelado como sendo tão importante quanto as possíveis mudanças estruturais causadas pelas EAOS, especialmente em células de longa vida pós-mitótica. Sua análise, bem como a de outros aspectos do dano oxidativo, pode ser otimizada pela escolha do modelo experimental mais adequado.<sup>158</sup>

Estudos indicam que os níveis de dano oxidativo frequentemente aumentam com a idade de um organismo. Indicadores de dano oxidativo tais como 8-deoxyguanosina, formado pelo dano oxidativo ao DNA e a taxa de deleção mitocondrial, causado pelo dano oxidativo ao DNA mitocondrial, são frequentemente altos em organismos velhos. Medidas de outros marcadores de dano oxidativo a

lipídios, proteínas e carboidratos também tendem a aumentar com o envelhecimento.<sup>159,160</sup>

Neste sentido, a *Drosophila melanogaster* parece ser o melhor organismo disponível para esse estudo. Dados experimentais a partir das análises da mortalidade de diversas espécies, têm corroborado com estes pressupostos, como é o caso dos resultados obtidos em *Drosophila melanogaster*. Com base nestas considerações, a associação entre o ambiente e a longevidade passa pelo entendimento da história de vida de uma dada espécie a partir de uma perspectiva evolutiva. A construção desta história passa pela análise da tabela de vida que nos dá a probabilidade de sobrevivência e da taxa de fertilidade em cada intervalo de idade num determinado tempo e local onde vive a espécie estudada. Neste contexto, a história de vida de muitos organismos inclui um período de envelhecimento que é caracterizado por um espaço de tempo em que ocorrem modificações corporais geralmente deteriorativas na fase final do adulto, ou seja, o processo de senescência, os mesmos sugeriram que aves vivem significativamente mais do que mamíferos de mesmo tamanho, mesmo tendo taxas metabólicas mais elevadas e níveis séricos de glicose superiores, características que só existem em mamíferos que apresentam envelhecimento acelerado.<sup>161</sup>

Dentro destas inúmeras facetas, podemos incluir padrões comportamentais e de relações biológicas, metabólicas e estruturais que cada espécie utiliza para se relacionar e se adaptar a um determinado meio, incluindo a modulação da longevidade.

#### 6.4 Considerações sobre o papel da maçã no envelhecimento e longevidade de *D. melanogaster*

Embora a composição clássica da maçã (carboidratos, proteínas, gorduras, vitaminas e sais minerais) não justifique por si só seus efeitos terapêuticos, os componentes não nutritivos também denominados componentes bioativos são os protagonistas desta característica. Estes compostos bioativos pertencem ao grande grupo dos flavonóides, que compõem uma ampla classe de substâncias de origem natural, cuja síntese não ocorre na espécie humana. Entretanto, tais compostos possuem uma série de propriedades farmacológicas que os fazem atuar sobre sistemas biológicos. Conseqüentemente, muitas dessas propriedades atuam de forma benéfica para a saúde humana.

Diversos ensaios “*in vivo*” e “*in vitro*” vêm comprovando e determinando a ampla variedade das atividades biológicas dos compostos flavonoídicos.<sup>162</sup> Destacam-se, dentre outros, os seguintes efeitos dos flavonóides sobre os sistemas biológicos: capacidade antioxidativa (esta constitui a atividade mais elucidada pelos estudos até agora desenvolvidos); atividades antiinflamatória e de efeito vasodilatador; ação antialérgica; atividade contra o desenvolvimento de tumores; anti-hepatotóxica, entre outras. Sabe-se que os flavonóides podem inibir vários estágios dos processos que estão diretamente relacionados com o início da aterosclerose, como ativação dos leucócitos, adesão, agregação e secreção de plaquetas.

Sistemas experimentais *in vitro* demonstram que a principal ação potencial dos flavonóides está em sua capacidade antioxidante.<sup>163</sup> Os mecanismos e a seqüência de eventos pelos quais os radicais livres interferem nas funções celulares

não estão completamente compreendidos, mas um dos mais importantes eventos parece ser a peroxidação lipídica.<sup>159, 164</sup>

No caso, os resultados obtidos no presente estudo, mesmo que em *Drosophila melanogaster*, corroboram com evidências científicas observadas em outros modelos experimentais e em humanos.<sup>165</sup>

Em síntese, com uma intensa busca na literatura de referências e publicações oficiais sobre longevidade e envelhecimento, pode-se destacar que nos últimos vinte anos muito pouco se explorou em relação à influência do alimento e, em particular, do *alimento funcional* sobre longevidade e parâmetros metabólicos fisiológicos associados, existindo desta forma uma carência enorme de estudos que contribuam para a elucidação destes processos, talvez pelo fato da utilização de modelos experimentais nos estudos de longevidade terem sido pouco explorados até o momento sob a ótica da genética, bioquímica, fisiologia agregados ao poder dos alimentos sobre o metabolismo. Entretanto, a intensificação destes estudos possivelmente terá um papel fundamental para não só se entender o papel dos alimentos funcionais sobre processos fisiológicos mas também para melhorar as condições de saúde e longevidade do ser humano.

---

*CONCLUSÃO*

## 7 CONCLUSÃO

No presente estudo foi investigado o efeito da maçã da cultivar Fuji, *in natura* e desidratada sobre a longevidade, parâmetros fisiológicos e indicadores de estresse oxidativo de *Drosophila melanogaster*.

Os resultados mostraram:

- que o tratamento de maçã a 10% tanto *in natura* quanto desidratada estenderam significativamente a longevidade de machos e fêmeas da mosca, ainda que o tratamento com 20% também tenha incrementado tal parâmetro biológico em relação ao grupo controle;
- que o tratamento com maçã a 10% modulou o armazenamento de lipídios, triglicerídios, glicogênio e proteínas de forma similar ao descrito na literatura em moscas selecionadas para maior longevidade;
- que o tratamento com maçã a 10% diminuiu o indicador de dano oxidativo sugerindo, assim, uma influência benéfica sobre a manutenção das funções metabólicas da mosca.

Em síntese o tratamento com *alimento funcional maçã* afetou de modo positivo tanto a longevidade quanto o metabolismo do modelo experimental investigado.

---

*REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 
- <sup>1</sup> Encontro das Universidades II FÓRUM PERMANENTE DA POLITICA NACIONAL DO IDOSO; 2000 Ago 24 e 25;Recife.
- <sup>2</sup> Organização Panamericana de Saúde. “Las condiciones de salud em las Américas. Washington:Organizacion Panamericana de la Salud(OPS);1994; 1.
- <sup>3</sup> Hayflick L. Como e Por que Envelhecemos. São Paulo: Campus;1996.
- <sup>4</sup> Organização Panamericana da Saúde. Programa envelhecimento e saúde. Ano Internacional das pessoas idosas: envelhecimento - Mitos na Berlinda 1999; 13.
- <sup>5</sup> Da Cruz IBM, Alho CS. Envelhecimento populacional: panorama epidemiológico e de saúde do Brasil e do Rio Grande do Sul. In: Jeckel-Neto EA, Da Cruz IBM, orgs. Aspectos biológicos e geriátricos do envelhecimento II. Porto Alegre: EDIPUCRS; 2000. p. 175-91.
- <sup>6</sup> Beattie BL, Louie VY. Nutrição e Envelhecimento. In: Gallo JJ, Busby-Whitehead J, Rabins PV, Silliman RA, Murphy JB. Reichel assistência ao idoso aspectos clínicos do envelhecimento. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001. p. 241-58.
- <sup>7</sup> Haveman-Nies A, De Groot LCPGM, van Staveren WA. Dietary quality, lifestyle factors and healthy aging in Europe: the SENECA study. Age and Ageing 2003;32:427-34.
- <sup>8</sup> Angelis RC. Importância de alimentos vegetais na proteção da saúde. São Paulo: Atheneu; 2001.

---

<sup>9</sup> Hasler CM. Functional foods their role in disease prevention and health promotion. Food. Technol 1998;52(11): 63-70.

<sup>10</sup> International food information council foundation (IFIC). Background on functional foods. 1999 Dec. [Capturado em 2002 abril 27]. Disponível em: <http://www.ific.org/proactive>.

<sup>11</sup> Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. Nutrition Reviews 1998;56(11):317-33.

<sup>12</sup> Renaud S, De Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. Lancet 1992;339:1523-26.

<sup>13</sup> ANVISA-Agência Nacional da Vigilância Sanitária. Resolução nº18, de 30 de abril de 1999 (republicada em 03/12/1999) e Resolução nº19, de 30 de abril de 1999 (republicada em 10/12/1999). [Capturado em 2003 novembro 10]. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/resol/18-99.htm>>e <http://www.anvisa.gov.br/legis/reso/19-99.htm>..

<sup>14</sup> III Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2001.

<sup>15</sup> Silva CRM, Naves MMV. Suplementação de vitaminas na prevenção de câncer. Rev Nutr 2001;14(2):1-15.

<sup>16</sup> Chaimowicz F. A Saúde dos idosos brasileiros às vésperas do século XXI: Problemas, projeções e alternativas. Rev Saúde Pública 1997;31(2):184-200.

<sup>17</sup> Veras RP, Ramos RL, Kalache A. Crescimento da população idosa no Brasil: Transformações e conseqüências na sociedade. Rev Saúde Pública 1987;21:225.

- 
- <sup>18</sup> Vaupel JW, Carey JR, Christensen K, Johnson TE, Yashin AI, Holm NV. Biodemographic trajectories of longevity. *Science* 1998; 280: 855-860.
- <sup>19</sup> OPAS/OMS. 26a Conferência sobre o envelhecimento no Brasil. In: Neri AL, Debert GG, organizadores. *Velhice e Sociedade: Papirus (coleção Vivacidade)*; 1999. p.11-40.
- <sup>20</sup> Os Idosos do Rio Grande do Sul: estudo multidimensional de suas condições de vida - relatório de Pesquisa. Conselho Estadual do Idoso, Governo Estado Rio Grande do Sul, Secretaria do Trabalho, Cidadania e Assistência Social e Unidades Associadas. Porto Alegre:CEI;1997,123p.
- <sup>21</sup> Da Cruz IBM, Schwanke CHA. Reflexões sobre biogerontologia como uma ciência generalista, integrativa e interativa. *Estud Interdiscip Envelh* 2001; 3:7-36.
- <sup>23</sup> Troen BR. The biology of aging. *The Mount Sinai Journal of Medicine* 2003; 70(1):3-17.
- <sup>23</sup> Neto EAJ. Gerontologia Biomédica – Uma perspectiva inovadora. *Revista Medicina PUCRS* 2000; 10(2): 98-101.
- <sup>24</sup> Carvalho Filho ET. Fisiologia do Envelhecimento. In: Papaléo Neto M. *Gerontologia*. São Paulo: ed. Atheneu; 1996. p.166-194.
- <sup>25</sup> Stehler B. *Time, cells and aging*. New York: Academic Press. 1982.
- <sup>26</sup> Arking R. *Biology of aging: Observations and principles*. 2a ed. Massachusetts: Sinauer Inc; 1998.
- <sup>27</sup> Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol* 1956; 11:298-300.

- 
- <sup>28</sup> Lints FA. The rate of living theory revisited. *Exp Gerontol* 1989; 35: 36-57.
- <sup>29</sup> Da Cruz IBM. Genética do envelhecimento, da longevidade e doenças crônico-degenerativas associadas à idade. In: Elisabete Viana de Freitas et al. *Tratado de Geriatria e Gerontologia*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2002.p.20-31.
- <sup>30</sup> Papaléo Netto M. O estudo da velhice no século XX: histórico, definição do campo e termos básicos . In: Elisabete Viana de Freitas et al. *Tratado de Geriatria e Gerontologia*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2002.p.02-12.
- <sup>31</sup> Berquó E. Considerações sobre o envelhecimento no Brasil. In: Néri AL, Debert GG, organizadores. *Velhice e Sociedade: Papirus (Coleção Vivacidade)*: 1999. p. 11-57.
- <sup>32</sup> Da Cruz IBM, Alho CS. Envelhecimento populacional: panorama epidemiológico e de saúde do Brasil e do Rio Grande do Sul. In: Jeckel-Neto EA, Da Cruz IBM, orgs. *Aspectos biológicos e geriátricos do envelhecimento II*. Porto Alegre: EDIPUCRS; 2000. p. 175-91.
- <sup>33</sup> Veras R. Desafios e conquistas advindas da longevidade da população: o setor saúde e suas necessárias transformações. In: *Velhice numa perspectiva de futuro saudável*. Rio de Janeiro: UnATI-UERJ; 2001.p.13-57.
- <sup>34</sup> Siviero J, Taufer M, Flores GAL, Cruz AM, Da Cruz IBM. Aspectos relacionados ao hábito alimentar e estilo de vida de idosos acima de 80 anos e de seus familiares cuidadores em Veranópolis-RS. *Revista Medicina PUCRS* 2002;12(4):324-50.
- <sup>35</sup> Flores GAL, Nascimento NMR, Cruz IBM. Aspectos biopsicossociais do idoso e do envelhecimento bem-sucedido. In: Jeckel-Neto EA, Cruz IBM, organizadores. *Aspectos Biológicos e Geriátricos do Envelhecimento*. Porto Alegre:EDIPUCRS; 2000;p.193-205.
- <sup>36</sup> Haliwell B, Gutteridge JMC, *Free radicals in Biology and Medicine*. 2a ed.Oxford: Clarendon Press, 1989.

- 
- <sup>37</sup> Halliwell B. Free radicals, antioxidantes and human disease: curiosity, cause or consequence? *Lancet* 1994;344:721-24.
- <sup>38</sup> Li S, Yang JQ, Oberley TD, Oberley LW. The role of celular glutathione peroxidase redox regulation in the supression of tumor cell growth by manganese superoxide dismutase. *Câncer Research* 2000;60:3927-9.
- <sup>39</sup> Andlauer W, Furst P. Antioxidante Power of Phytochemicals With Special Referece to Cereals. *Cereal Foods World* 1998;43(5):356-60.
- <sup>40</sup> Bradford RW, Allen HW, Culbert ML. *Oxidology-The study of reactive oxigen toxic species and their metabolism in the health and disease*. Published by The Robert W Bradford Foundation, Los Altos, Califórnia 1985.
- <sup>41</sup> Harman D. Aging a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol* 1956; 11:298-300.
- <sup>42</sup> Dröge, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82: 47-95.
- <sup>43</sup> Halliwell B. Antioxidant defence mechanism: from beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res* 1999;31(4):261-72.
- <sup>44</sup> Pansarasa O, Felzani G, Vecchiet J, Marzatico F. Antioxidant pathways in human aged skeletal muscle: relationship with the distribution of type II fibers. *Experimental Gerontology* 2002; 37: 1069-1079.
- <sup>45</sup> Mates JM, Pérez-Gomez C, Castro INN. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 1999; 32(8): 959-603.
- <sup>46</sup> Halliwell B y Gutteridge J. In. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Third edition,. Oxford University Press New York: 1999; p 1-33.

- 
- <sup>47</sup> Richter C, Godvadze V, Laffranchi R, Schlapbach R, Schnizer M, Suter M, et al. Oxidants in mitocôndria: from physiology to disease. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1271: 67-84.
- <sup>48</sup> Pincemail J. Free radicals and antioxidants in human diseases. In: *Analysis of free radicals in biological systems*. Birkhäuser Verlag; Favier et al.; 1999.
- <sup>49</sup> Thomas JA, Mallis RJ. Aging and oxidation of reactive protein sulfhydryls. *Experimental Gerontology* 2001; 36:1519-1526.
- <sup>50</sup> Berger R.& Garnier Y. Pathophysiology of brain damage. *Brain Res Rev* 1999; 30:107-134.
- <sup>51</sup> Levine RL, Stadtman ER. Oxidative modification of proteins during aging. *Experimental Gerontology* 2001;36:1495-1502.
- <sup>52</sup> Cadenas E. Biochemistry of oxygen toxicity, *Ann. Rev. Biochem* 1989; 58: 79-110.
- <sup>53</sup> Bernardi P, Petronilli V, Di Lisa F, Forte M. A mitochondrial perspective on cell death. *Trends Biochem Sci* 2001;26:112-117.
- <sup>54</sup> Saskia A, B, E, van Accker. Bast A, A, L, T. Structural Aspects of Antioxidant Activity of Flavonoids. In: *Flavonoids in Health and Disease*. Ed Marcel Dekker, INC. New York, 1998;9.221-251.
- <sup>55</sup> Linton S, Davies MJ, Dean RT. Protein oxidation and ageing. *Experimental Gerontology* 2001; 36: 1503-1518.
- <sup>56</sup> Wood SM; Watson RR. Antioxidants and cancer in the aged. *Handbook of Nutrition in the aged*. 2nd Edition. CRC Press, Inc, 1994.
- <sup>57</sup> Wispe JR, Clarek JC, Burnhans MS, Kroop KE, Kofhagen TR, Whitsett J. Synthesis and processing of the precursor for human manganese-superoxide dismutase. *Biochem Biophys Acta* 1989; 994: 30-36.

- 
- <sup>58</sup> Furukava T, Meydani SN, Blumberg JB. Reversal of age-associated decline in immune responsiveness by dietary glutathione supplementation in mice. *Mech Ageing Dev* 1997; 38: 107-117.
- <sup>59</sup> Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, et al. Significance of melatonin in antioxidative defense system: Reactions and products. *Biol Signals Recept* 2000;9:137-169.
- <sup>60</sup> Harris ED. Regulation of antioxidant enzymes. *FASEB J* 1992;6:2675-83.
- <sup>61</sup> Joshipura KJ, Hu FB, Manson JE, et al. The effect of fruit and vegetable intake on risk for coronary heart disease. *Ann Intern Med* 2001;134:1106-1114.
- <sup>62</sup> Andlauer, W.; Fürst, P. Antioxidative Power of Phytochemicals With Special Reference to Cereals. *Cereal Foods World* 1998; 43(5): 356-60.
- <sup>63</sup> Craig WJ. Phytochemicals, Guardians of our Health. *J Am Diet Ass* 1997 (10Suppl 2): S199-204.
- <sup>64</sup> Wispe JR, Clarek JC, Burnhans MS, Kroop KE, Kofhagen TR, Whitsett J. Synthesis and processing of the precursor for human mangano-superoxide dismutase. *Biochem Biophys Acta* 1989; 994: 30-36.
- <sup>65</sup> Okatani Y, Wakatsuki a, Kaneda C. Melatonin increases activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase in fetal rat brain. *J Pineal Res* 2000;28 :89-99.
- <sup>66</sup> Cand F, Verdetti J, Superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase and lipid peroxidation in the major organs of the aging rats. *Free Radic Biol Med* 1989; 7: 59-69.
- <sup>67</sup> Lee SH, Oe T, Blair IA. Vitamin C-induced decomposition of lipid hydroperoxides to endogenous genotoxins. *Science* 2001; 292: 2083-2086.

- 
- <sup>68</sup> Forsberg L, Faire U, Morgenstern R. Oxidative Stress, human genetic variation and disease. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2001; 389(1): 84-93.
- <sup>69</sup> Benzi G, Moretti A. Are reactive oxygen species involved in Alzheimer's disease? *Neurobiology of Aging* 1995; 16(4): 661-674.
- <sup>70</sup> Functional foods – position of the American Dietetic Association. *J Am Diet Assoc* 1999; 99:1278-85.
- <sup>71</sup> Salder MJ and Salt MM. *Functional Foods. The Consumer the Product and the Evidence.* The Royal Soc Chemistry, UK;1998.p. 215.
- <sup>72</sup> Graig WJ. Phytochemicals: Guardians of our Healthh. *J Am Diet Assoc* 1997; 10 (suppl 2): 199-204.
- <sup>73</sup> Arai S. Studies on functional foods in Japan State of the art. *Biosci Biotech Biochem* 1998; 60: 9-15.
- <sup>74</sup> Strauss L, Santti R, Saarinen N, et al. Dietary phytoestrogens and their role in hormonally dependent disease. *Toxicology Letters*1998; 102-103: 349-354.
- <sup>75</sup> Kerry NL, Abbey M. Red wine and fractionated phenolic compounds prepared from red wine inhibit low density lipoprotein oxidation in vitro. *Atherosclerosis* 1997; 135(1):93-102.
- <sup>76</sup> Julie A, Ross E, Christine M. Kasum, *Dietary Flavonoids: Bioavailability, Metabolie Effects, and Safety . Annu Nutr Rev* 2002; 22:19-34.
- <sup>77</sup> Dokkum, wim Van."Polyphenols in food". *Proceedings of the COST 916 meeting in Aberdeen (Scotland), April 1997.*

- 
- <sup>78</sup> Hollman PC, Katan MB. Health effects and bioavailability of dietary flavonols. State Institute for Quality Control of Agricultural Products (IKILT-DLO), Wageningen, The Netherlands. 1999; Dez; (Suppl 31): S75.
- <sup>79</sup> Bioactive inositol phosphates and phytosterols in foods". Proceedings of the COST 916 meeting in Sweden, October 1997.
- <sup>80</sup> Vannucchi H, Jordão Jr A. Radicais livres, antioxidantes e dieta: a importância das frutas e verduras. In: de Angelis RC. Importância de alimentos vegetais na proteção da saúde: fisiologia da nutrição protetora e preventiva de enfermidades degenerativas. São Paulo: Atheneu; 2001. p. 193-201.
- <sup>81</sup> Croft KD. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. New York: Annals of the New York Academy of Science; 1998;854: 435-442.
- <sup>82</sup> Ferguson LR, Harris P.J. Protection against cancer by wheat bran: role of dietary fibre and phytochemicals. Oxford: European Journal of Cancer Prevention. 1999; 8(1):17-25.
- <sup>83</sup> Angelis RC. Importância de Alimentos Funcionais na Proteção da Saúde. São Paulo: Atheneu;2001.
- <sup>84</sup> Barnes S, Kim H, Xu J. Soy in the prevention and treatment of chronic diseases. Congresso Brasileiro da Soja; 1999. p. 295-304.
- <sup>85</sup> Bravo, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. New York: Nutrition Reviews; 1998 . v 56, n.11, p. 317-333.
- <sup>86</sup> Salgado MJ. Fitoestrógenos da soja. In: de Angelis RC. Importância de alimentos vegetais na proteção da saúde: fisiologia da nutrição protetora e preventiva de enfermidades degenerativas. São Paulo: Atheneu; 2001. p. 181-192.
- <sup>87</sup> Graig WJ. Phytochemicals: Guardians of our Healthh. J Am Diet Assoc 1997; 10 (suppl 2): 199-204.

- 
- <sup>88</sup> Jovanovic SV, Steenken S, Simic MG, Hara Y. Antioxidant properties of flavonoids: reduction potentials and electron transfer reaction of flavonoid radicals. In Rice Evans C, Packer L Ed. *Flavonoids in Health and Disease*. New York: Marcel Dekker; 1998: p 137-61.
- <sup>89</sup> Trumbo P, Schlicker S, Yates A, Allison, Poos M. Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein and Amino Acids. *Journal of The American Dietetic Association*. November 2002;102(11): 1621-1630.
- <sup>90</sup> Monsen ER. Dietary reference intakes for the antioxidant nutrients: vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids. *J Am Diet Assoc* 2000 June; 100(6): 637-40.
- <sup>91</sup> Barnes S, Kim H, Xu J. Soy In The Prevention And Treatment Of Chronic Diseases. *Congresso Brasileiro Da Soja*, Pp. 295-304. 1999.
- <sup>92</sup> Andlauer W, Fürst P. Antioxidative Power Of Phytochemicals With Special Reference To Cereals. *Cereal Foods World*. 1998; 43(5):356-60.
- <sup>93</sup> "Polyphenols in food". proceedings of the cost 916 meeting in aberdeen (scotland), April 1997.
- <sup>94</sup> World Health Organization. *Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases*, Geneva; 1990.
- <sup>95</sup> Strauss L, Santti R, Saarinen N Et Al. Dietary Phytoestrogens And Their Role In Hormonally Dependent Disease. *Toxicology Letters*, V.102-103, Pp. 349-354, 1998.
- <sup>96</sup> Knekt P, Kumpulainen J, Järvinen R, et al. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr* 2002; 76:560-8.
- <sup>97</sup> Andlauer W, Fürst P. Antioxidative power of phytochemicals with special reference to cereals. *Cereal Foods World* 1998; 43(5):356-60.

- 
- <sup>98</sup> Porrini M, Riso P, Testolin G. Absorption of lycopene from single or daily portions of raw and processed tomato. *British J Nutr* 1998;80:853-61.
- <sup>99</sup> Background on functional foods. International food information council foundation (IFIC) 1999 December. [Capturado em 27 de abril de 2002]. Disponível em: <http://www.ific.org/proactive>.
- <sup>100</sup> Peterson J, Duyer J. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. *Nutrition Research*; 1998;18(12):1995-2018.
- <sup>101</sup> Bors W, Heller W, Michael C, Saran M. Flavonols as antioxidants: determination of radical scavenging efficiencies. *Methods Enzymol* 1990; 186:343-355.
- <sup>102</sup> Middleton E, Kandaswami C. The impact of flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. In: Harbone, JB, Ed. *The Flavonoids: 1986; Advances in Research Since*.
- <sup>103</sup> Ross Ja, Kasum Cm. Dietary Flavonoids: Bioavailability, Metabolic Effects, And Safety. *Annu Ver Nutr* 2002; 22:19-34.
- <sup>104</sup> Croft KD. The Chemistry And Biological Effects Of Flavonoids And Phenolic Acids. *Annas Of The New York Academy Of Science* 1998; 854:435-42
- <sup>105</sup> Ferguson Lr, Harris Pj. Protection Against Cancer By Wheat Bran: Role Of Dietary Fibre And Phytochemicals. *European Journal Of Cancer Prevention* 1999; 8(1):17-25.
- <sup>106</sup> Kryadl D, Lukito W. Functional food and contemporary nutrition-health paradigm: tempeh and its potential beneficial effects in disease prevention and treatment *J. Nutr* 2000;16(697):7-8.
- <sup>107</sup> Ross Ja, Kasum Cm. Dietary Flavonoids: Bioavailability, Metabolic Effects, And Safety. *Annu Ver Nutr* 2002; 22:19-34.

- 
- <sup>108</sup> Rowland M, Tozer TN. Pharmacokinetics: Concepts and applications. 3ed. Baltimore: 1995.
- <sup>109</sup> Hollman PCH, Katan M. Absorption, Metabolism and Bioavailability of Flavonoids. In: Flavonoids in Health and Disease.. New York: Ed Marcel Dekker;1998;22: 483-522.
- <sup>110</sup> Shali N, Curtis C, Powell G. Sulphation of the flavonoids quercetin and catechin by rat liver. Xenobiotica 1991;21,881-893.
- <sup>111</sup> Hertog MGL, Hollman PC, Katan MB. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. Nutr Cancer 1993;20, 21-29.
- <sup>112</sup> Liu RH, Eberhardt MV, Lee CY Antioxidant and antiproliferative activities of selected New York apple cultivars. N.Y.Fruit Q 2001;9:15-17.
- <sup>113</sup> [www.abpm.org.br](http://www.abpm.org.br) [consulta: 04 de abril de 2004].
- <sup>114</sup> Allen JC, Hamilton RJ. Rancidity in foods. London: Applied Science; 1983; p199.
- <sup>115</sup> Yoshida Y, Katsurayama Y. Melhoramento genético da macieira no Brasil. Perspectivas e contribuições das cultivares japonesas. Agropecuária Catarinense; Florianópolis; 1993;06(4):12-15.
- <sup>116</sup> Denardi F, Camilo AP. Maçã: In: EPAGRI. Recomendação de cultivares para o Estado de Santa Catarina-SC; 1997.
- <sup>117</sup> Imeh U e Khokhar 2002 –Distribution of conjugated and free phenols in fruits: antioxidant activity and cultivar variations. J Agric Food Chem 2003;50:6301-06.

- 
- <sup>118</sup> Wolfe K, Wu X, Liu RH. Antioxidant activity of apple peels. *J Agric Food Chem* 51:1676-1683.
- <sup>119</sup> Wolfe KL and Liu RH. Apple peels as a value-added food ingredient. *J Agric Food Chem* 51:609-614, 2003.
- <sup>120</sup> Pearson DA, Tan CH, Gernam JB, Davis PA, Gershwin ME. Apple juice inhibits human low density lipoprotein oxidation. *Life Sciences* 1999;21:1913-1920.
- <sup>121</sup> Lotito S e Frei Balz. Relevance of apple polyphenols as antioxidants in human plasma: contrasting in vitro and in vivo effects. *Free Rad Biol Med* 2004;36:201-211.
- <sup>122</sup> Rogers EJ, Milhalik S, Ortiz D, Shea TB. Apple juice prevents oxidative stress and impaired cognitive performance caused by genetic and dietary deficiencies in mice. *J Nut Heat & Aging* 2003;7:01-06.
- <sup>123</sup> Futuyama DJ. *Biologia Evolutiva*. Sociedade Brasileira de Genética/CNPq, Ribeirão Preto. 1992; p.646.
- <sup>124</sup> Panizzi AR, Parra JRP. *Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas*. São Paulo, 1991; p.35.
- <sup>125</sup> Buck S, Nicholson M, Dudas S, Wells R, Force A, Baker GT, Arking R. Larval regulation of adult longevity in a genetically-selected long-lived strain of *Drosophila*. *Heredity*. 1993;71:23-32.
- <sup>126</sup> Lints FA. Genetics, in: *Drosophila as a model organism for ageing in Drosophila*. *Nature New Biol* 1998;229: 86-88.
- <sup>127</sup> Lints FA, Lints CV. Relationship between growth and ageing in *Drosophila*. 1998; *Nature New Biol*; 229: 86-88.

- 
- <sup>128</sup> Folch J, Lees M and Ffolioane-Stanley GH. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal Biological Chemistry*. 1957; 226: 497-509.
- <sup>129</sup> Van HE. Estimation of glycogen in small amount soft tissue. *Analytical Biochemistry* 1965;11:256-265.
- <sup>130</sup> Lowry OH, Rosebrough UGH, Farr AL, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal Biological Chemistry*. 1951;193:265-269.
- <sup>131</sup> Meerson FZ, Kagan VE, Kozlov YP. *Basic Res. Cardiol* 1982;77:465-468.
- <sup>132</sup> Buege JA & Aust SD. *Meth Enzymol* 1978; 52: 302-309.
- <sup>133</sup> King A, Young G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *J Am Diet Assoc* 1999 Feb; 99(2):213-8.
- <sup>134</sup> Sauvaget C, Nagano J, Allen N, Kodama K. Vegetable and fruit intake and stroke mortality Hiroshima/Nagasaki Life Span Study. *Stroke* 2003;34(10):2355-60.
- <sup>135</sup> Miquel J, Fleming J e Economos AC. Antioxidants, metabolic rate and aging in *Drosophila* and mice. *Exp Gerontol* 1982;1:159-165.
- <sup>136</sup> Driver C e Georgeou A. Variable effects of vitamin E on *Drosophila* longevity. *Biogerontology* 2003;4:91-95.
- <sup>137</sup> Bradford RW, Allen HW, Culbert ML. *Oxidology – The study of reactive oxygen toxic species and their metabolism in health and disease*. Los Altos, California: Robert W Bradford Foundation, 1985.
- <sup>138</sup> Rogers EJ, Milhalik S, Ortiz D, Shea TB. Apple juice prevents oxidative stress and impaired cognitive performance caused by genetic and dietary deficiencies in mice. *The Journal of Nutrition, Health and Aging* 2003; 7:1-6.

- 
- <sup>139</sup> Tsao R, Yang R, Young C, Zhu H. Polyphenolic profiles in eight apple cultivars using high-performance liquid chromatography (HPLC). *J Agric Food Chem* 2003;51:6347-6353.
- <sup>140</sup> Butov A, Carey JR, Volkov MA, Sehl ME, Yashin AI. Reproduction and survival in Mediterranean fruit flies: "a protein and energy" free radical model of aging. *Biogerontology* 2003;4:387-395.
- <sup>141</sup> Djawdan M, Chippindale AK, Rose MR. Metabolic reserves and stress resistance in *Drosophila melanogaster*. *Physiol Zool* 1998;71:584-594.
- <sup>142</sup> Borash DJ e Ho GT. Patterns of selection: stress resistance and energy storage in density-dependent populations of *Drosophila melanogaster*. *J Insec Physiol* 2001;47:1349-1356.
- <sup>143</sup> Imeh U, Khokhar S. Distribution of conjugated and free phenols in fruits: antioxidant activity and cultivar variations. *J Agric Food Chem* 2002;50:6301-6306.
- <sup>144</sup> Luckinbil LS. Selection for longevity confers resistance to low temperature stress in *Drosophila melanogaster*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 1998;53:B147-53.
- <sup>145</sup> Longo VD e Finch CE. Evolutionary Medicine: from dwarf model systems to healthy centenarians? 2003;299:1342-46.
- <sup>146</sup> Rissanen HT, Voutilainen S, Virtanen KJ, Venho B, Vanharanta MJ, Salonen YJ. Low intake of fruits, berries and vegetable is associated with excess mortality in men: the kuopio ischaemic heart disease risk factor (KIHD) study. *Nutritional Epidemiology* 2003; 133:199-204.
- <sup>147</sup> Chapman RF. *The insects: structure and function*. 4a ed. New York: Cambridge University Press. 1998; p. 770.

- 
- <sup>148</sup> Borges E, Quadros CF, Nascimento CJ. Perfil metabólico e reprodutivo de adultos de *Anastrepha fraterculus* (díptera, tephritidae) em diferentes idades. *Biociências* 2001;9(2):39-49.
- <sup>149</sup> Seroude L, Brummel T, Kapahi P, Benzer S. Spatio-temporal analysis of gene expression during aging in *Drosophila melanogaster*. *Aging Cell* 2002;1:47-56.
- <sup>150</sup> Lee WK, Kim JY, Kim OD, Lee JH, Lee YC. Major phenolics in apple and their contribution to the total antioxidant capacity. *J Agric Food Chem* 2003;51:6516-6520.
- <sup>151</sup> Driver C & Georgeou A. Variable effects of vitamin E on *Drosophila* longevity. *Biogerontology* 2003; 4:91-95.
- <sup>152</sup> Da Cruz IBM, Taufer M, Moriguchi EH. *Geriatría Genômica*. Editora Atheneu. São Paulo 2003; no prelo.
- <sup>153</sup> Sohal SR. Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process. *Free Radical Biology & Medicine* 2002;33(1):37-44.
- <sup>154</sup> Parsons AP. From the stress theory of aging to energetic and evolutionary expectations for longevity. *Biogerontology* 2003; 4:63-73.
- <sup>155</sup> Butov AA, Carey RJ, Volkov AM, Sehl EM, Yashin IA. Reproduction and survival in mediterranean fruit flies: a “ protein and energy” free radical model of aging. *Biogerontology* 2003;4:387-395.
- <sup>156</sup> Sohal RS & Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction and aging. *Science* 1996; 273:p 59-63.
- <sup>157</sup> Kirby K, Hu J, Hilliker JA and Phillips PJ. RNA interference-mediated silencing of *Sod2* in *Drosophila* leads to early adult-onset mortality and elevated endogenous oxidative stress. *PNAS* 2002; 99:1-6.

- 
- <sup>158</sup> Wulf Dröge: Free radicals in the physiological control of cell function. American Physiological Society *Physiol Rev* 2002; 82:47-95.
- <sup>159</sup> Marnett LJ. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res.* 1999 Mar 8;424(1-2):83-95.
- <sup>160</sup> Gil P, Farinas F, Casado A, Fernández LE. Malondialdehyde: A Possible Maker of Ageing *Gerontology* 2002; 48: 209-214.
- <sup>161</sup> Finch CE. Longevity, Senescence and the Genome. Chicago: Chicago Press; 1990.
- <sup>162</sup> Miller LA. Antioxidant Flavonoids: structure, function and clinical usage. *Nutr Health Aging* 2004;8(2):92-7.
- <sup>163</sup> Knekt P, Jarvinen R, Reunanen A, Maatela J. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *Am J Clin Nut* 2002; 76:560-8.
- <sup>164</sup> Pearson AD, Tan HC, German BJ, Davis AP, Gershwin EM. Apple juice inhibits human low density lipoprotein oxidation. *Life Sciences* 1999; 64(21):1-8.
- <sup>165</sup> Lotito BS, Balz Frei. Relevance of apple polyphenols as antioxidants in human plasma: contrasting in vitro and vivo effects. *Free Radical Biology & Medicine* 2004; 36(2):201-211.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)