



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE QUÍMICA

**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE
ALIMENTOS**

**Bioatividade de Resíduos da Vitivinicultura em Células de
Hepatocarcinoma Humano**

NATHALIA FERRARI FONSECA DE SALES

ALEXANDRE GUEDES TORRES

ORIENTADOR

TATIANA EL-BACHA PORTO

COORIENTADORA

Dezembro 2013

NATHALIA FERRARI FONSECA DE SALES

**Bioatividade de Resíduos da Vitivinicultura em Linhagem de Células de
Hepatocarcinoma Humano**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Alexandre Guedes Torres

Orientador

Tatiana El-Bacha

Coorientadora

RIO DE JANEIRO

2013

S163

Sales, Nathalia Ferrari Fonseca de.

Bioatividade de resíduos da vitivinicultura em linhagem de células de Hepatocarcinoma humano / Nathalia Ferrari Fonseca de Sales. -- Rio de Janeiro: UFRJ/ IQ, 2013.

94f.: il.

Orientadores: Alexandre Guedes Torres e Tatiana El-Bacha.

Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Rio de Janeiro, 2013.

1. Resíduo da vitivinicultura. 2. Compostos fenólicos. 3. Capacidade antioxidante celular. 4. Bioatividade celular. I. Torres, Alexandre Guedes. (Orient). II. El-Bacha, Tatiana. (Orient.). III. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Química. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. IV. Título.

CDD: 543

Nathalia Ferrari Fonseca de Sales

**Bioatividade de Resíduos da Vitivinicultura em Linhagem de Células de
Hepatocarcinoma Humano**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovada em: 20/12/2013

Alexandre Guedes Torres, DSc., Instituto de Química – UFRJ (Orientador)

Tatiana El-Bacha, DSc., Instituto de Nutrição Josué de Castro – UFRJ (Coorientadora)

Eliane Fialho de Oliveira, DSc., Instituto de Nutrição Josué de Castro – UFRJ

Felipe Leite de Oliveira, DSc., Instituto de Ciências Biomédicas – UFRJ

Rio de Janeiro

Dezembro 2013

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, pelo amor e apoio incondicional durante o período do meu mestrado. Pela confiança depositada em mim, não permitindo que eu desistisse mesmo nos momentos mais difíceis. Dedico a vocês, com todo meu amor.

AGRADECIMENTOS

À Deus por tudo na minha vida, pelas pessoas que encontrei durante meu mestrado e pelas pessoas que ainda continuam comigo. Sei que durante toda a minha caminhada fui guiada por Ele, que me deu forças nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais, Ivanilson e Rosangela, e minha irmã Daniela, pela presença constante, por serem exemplos de amor, pelos princípios de vida compartilhados comigo e por me ensinarem a cada dia o valor da união e do amor verdadeiro.

À minha avó Inês (*in memoriam*), pelos ensinamentos, momentos, histórias, pelo exemplo de pessoa, pela influência e pelos princípios de vida passados a mim.

Ao meu namorado e amigo, Carlos, por todo carinho, compreensão, companheirismo, pelos abraços e sorrisos, por estar comigo nos melhores e piores momentos, pela paciência e por todo amor.

À minha grande família, pelo apoio, convívio, carinho e amor.

Àqueles que considero minha família, Zelina, Jorge, Karla, Laura, Everton e Diego, pelo carinho, pela convivência e pelo amor, dados de forma sincera e verdadeira.

Às minhas amigas: Bia, Thay, Mari, Nanda, Marina, Rubia, Flaviani, Mari Joemio e Jenni, pelas risadas, conversas, saídas, conselhos, obrigada por compreenderem minha ausência e apoiarem minhas escolhas, sempre.

Às minhas amigas de toda a vida, Raíssa, Joice e Jeane, que apesar da distância, nunca deixaram de me apoiar. Obrigada pela amizade mais que verdadeira, pelo amor e por fazerem a diferença na minha vida.

Às minhas amigas e companheiras de mestrado, Fabi, Vivi, Vanessa e Karla, por todos os momentos vividos, pelas conversas, risadas, bobagens, pelos conselhos e pelo apoio nos momentos difíceis.

Às amigas conquistadas durante esta caminhada, Suellen, Nathalia, Jéssica e Fabrício, pela amizade, pela ajuda e convívio.

Aos meus amigos Eduardo, Laidson e Rafael, pelas conversas, apoio, incentivo, por sempre estarem disponíveis a me ajudar. Obrigada pela amizade e carinho sinceros.

Aos meus orientadores, Alexandre e Tatiana, pelos conselhos e conhecimentos compartilhados, pela confiança no meu potencial, que contribuiu para o meu crescimento. Obrigada pela paciência e incentivo, que foram necessários para a conclusão desta etapa.

A toda equipe do Laboratório de Bioquímica Nutricional e de Alimentos, pelos conhecimentos e momentos compartilhados durante o mestrado.

A toda equipe da Embrapa Agroindústria de Alimentos, em especial à Professora Lourdes, Ana Paula, Natalia, Flávia, Chorão, William, Priscila e Cássia, pela ajuda, pelo convívio e momentos compartilhados.

A toda equipe do Laboratório de Proliferação e Diferenciação Celular, pela acolhida e gentileza. Em especial à Professora Márcia Cury, por disponibilizar o laboratório para a realização de uma das etapas do meu mestrado; ao Professor Felipe de Oliveira, por me acompanhar e pelos ensinamentos divididos; à Mariana pela paciência e disponibilidade para me ensinar e dividir comigo seus conhecimentos.

Aos meus amigos do Laboratório 545, Filipe, Patricia, Cynthia, Karine, pelos encontros sempre divertidos, conversas e conselhos.

A todos aqueles que contribuíram direta e indiretamente para este momento.

A CNPq pela concessão de bolsa.

RESUMO

Sales, Nathalia Ferrari Fonseca de. **BIOATIVIDADE DE RESÍDUOS DA VITIVINICULTURA EM CÉLULAS DE HEPATOCARCINOMA HUMANO**. Rio de Janeiro, 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências). Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

O principal resíduo da vitivinicultura é o bagaço, que é composto de semente e casca. Dados industriais indicam que de cada 100 L de vinho produzidos, 20 kg de bagaço são gerados. O bagaço proveniente da vitivinicultura contém teores elevados de compostos originalmente presente nas uvas. Estes compostos, especialmente os polifenólicos, podem apresentar interesse tecnológico e elevado potencial nutracêutico. É sabido que o consumo de alimentos com alto teor de compostos fenólicos está inversamente associado ao risco de desenvolvimento de doenças crônicas não-transmissíveis, tais como câncer e doenças cardiovasculares. Atualmente, grande parte do resíduo produzido na vitivinicultura é desperdiçada ou subutilizada, sugerindo que o conhecimento de métodos de extração dos componentes bioativos presentes neste resíduo industrial e a investigação de sua bioatividade podem contribuir para sua valoração. Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar extratos de resíduos industriais da vinificação em branco de uvas tintas quanto ao seu teor de componentes bioativos e avaliar sua bioatividade e capacidade antioxidante em cultura de células de hepatocarcinoma humano, HepG2. Os resíduos foram obtidos de indústrias de vitivinificação de Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul, e foram preparados extratos hidroalcoólicos, concentrados por nanofiltração. Os extratos dos resíduos apresentaram altos teores de fenólicos e flavonóides totais e de antocianinas totais e monoméricas, indicando alta eficiência do método de extração utilizado. Similarmente, os extratos apresentaram elevada capacidade antioxidante, avaliada pelos métodos ORAC, TEAC e TRAP, sugerindo o potencial bioativo dos resíduos. Ao avaliar sua bioatividade, foi observado que os extratos apresentaram-se citotóxicos de forma tempo e concentração dependente. Incubação de curto prazo não afetou a viabilidade das células HepG2, ao passo que incubação a médio e longo prazo resultaram, respectivamente, na diminuição de 37% e 75% da viabilidade. Interessantemente, os extratos dos resíduos não foram citotóxicos para células normais de fibroblastos humanos. Os resultados do ensaio de morte celular mostraram que as células incubadas com o extrato foram induzidas principalmente à morte por apoptose, porém este não foi o único mecanismo, pois houve um grande número de células necróticas. Os resultados da capacidade antioxidante celular mostraram que os compostos bioativos

presentes no extrato protegeram as células HepG2 contra os efeitos das espécies reativas de oxigênio (ROS), quando incubadas. Desta forma, podemos concluir que os extratos produzidos a partir de resíduos da vitivinicultura apresentam elevada atividade antioxidante e potencial efeito seletivo anti-câncer. Adicionalmente, podemos sugerir que a redução na produção de ROS, promovida pelos extratos, contribuiu para a citotoxicidade observada em tempos mais longos de incubação.

Palavras-chave: resíduo da vitivinicultura, compostos fenólicos, capacidade antioxidante celular, bioatividade celular.

ABSTRACT

Sales, Nathalia Ferrari Fonseca de. *BIOATIVIDADE DE RESÍDUOS DA VITIVINICULTURA EM CÉLULAS DE HEPATOCARCINOMA HUMANO*. Rio de Janeiro, 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências). Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

The main residue of the wine industry is marc, which is composed of seed and peel. Industry data indicate that for each 100 L of wine produced 20 kg of bagasse are generated. The marc from the viniculture contains high levels of compounds originally present in grapes. These compounds, especially polyphenols, may have high technological interest and nutraceutical potential. It is well known that the consumption of foods with high content of phenolic compounds is inversely associated with risk of development of chronic non-communicable diseases such as cancer and cardiovascular diseases. Currently, much of the waste produced in the wine industry is wasted or underutilized, suggesting that knowledge of methods of extraction of bioactive components present in this industrial waste and its bioactivity may contribute to its evaluation. The objective of this study was to characterize extracts of industrial waste in the vinification of white grapes for their content of bioactive components and evaluate its bioactivity and antioxidant capacity in human hepatocellular carcinoma, cells HepG2. The residues were obtained from wineries of Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul, and hydroalcoholic extracts, concentrated by nanofiltration were prepared. Extracts of the waste samples showed high levels of total phenolics, flavonoids, total and monomeric anthocyanins, indicating high efficiency of the extraction method used. Similarly, the extracts showed high antioxidant capacity, assessed by ORAC, TEAC and TRAP methods, suggesting the potential bioactive waste. To evaluate its bioactivity, we found that the extracts showed cytotoxic up time and concentration dependent manner. Incubation time did not affect the viability of HepG2 cells, whereas incubation in the medium and long term resulted, respectively, decreased 37% and 75 % viability. Interestingly, the extracts of the residues were not cytotoxic to normal human fibroblast cells. The death cell assay results showed that cell death in cells incubated with the extract was mainly induced death by apoptosis but this was not the only mechanism since there were a large number of necrotic cells. The results of the cellular antioxidant capacity showed that the bioactive compounds present in the extract protected HepG2 cells against the effects of reactive oxygen species (ROS), when incubated. Thus, we conclude that the extracts produced from waste from winemaking have high antioxidant activity and potential selective anti-cancer effect. Additionally, we suggest that

the reduction in ROS production, promoted by extracts, contributed to the cytotoxicity observed at longer incubation times.

Keywords: waste of viticulture, phenolic compounds, cellular antioxidant capacity, cell bioactivity.

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1.</i> Fluxograma simplificado do processo de fabricação de vinho. -----	21
<i>Figura 2.</i> Imagem de corte transversal da uva tinta. Na foto distinguem-se a casca, polpa e sementes -----	26
<i>Figura 3.</i> Estrutura química de flavonóides selecionados -----	27
<i>Figura 4.</i> Alvos das espécies reativas de oxigênio-----	30
<i>Figura 5.</i> Redução do ABTS•+ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio-----	32
<i>Figura 6.</i> Reação do radical AAPH durante o ensaio de ORAC-----	33
<i>Figura 7.</i> Representação esquemática da metodologia e do princípio proposto do ensaio de CAC -----	35
<i>Figura 8.</i> Microscopia de contraste de fase das células HepG2-----	36
<i>Figura 9.</i> Reação da redução do composto MTT, de coloração amarela, a formazan (cristais de coloração roxa). -----	38
<i>Figura 10.</i> Conversão de resazurina para resorufina por meio de atividade metabólica das células, gerando um produto fluorescente -----	38
<i>Figura 11.</i> Bagaço de uva proveniente da fabricação de vinho branco. -----	43
<i>Figura 12.</i> Extratos bruto (Alimentação) e concentrado (Retido) -----	44
<i>Figura 13.</i> Efeito do etanol sobre a viabilidade celular das células da linhagem HepG2 (24 h) -----	58
<i>Figura 14.</i> Efeito do extrato hidroetanólico de resíduo da vitivinicultura bruto sobre a viabilidade celular da linhagem HepG2 (24 h)-----	59
<i>Figura 15.</i> Microscopia de contraste de fase das células HepG2 incubadas com etanol (controle pareado) e extrato hidroetanólico de resíduo da vitivinicultura por 24 horas --	61
<i>Figura 16.</i> Efeito do etanol sobre a viabilidade celular da linhagem HepG2 (1 h)-----	62
<i>Figura 17.</i> Efeito do extrato de resíduo da vitivinicultura concentrado por nanofiltração sobre a viabilidade celular da linhagem HepG2 (1 h) -----	63

<i>Figura 18.</i> Efeito do extrato de resíduo da vitivinicultura concentrado por nanofiltração sobre a viabilidade celular da linhagem HepG2 (5 h) -----	64
<i>Figura 19.</i> Efeito do etanol (24 h) sobre a viabilidade celular da linhagem HepG2 -----	65
<i>Figura 20.</i> Efeito do extrato de resíduo da vitivinicultura concentrado por nanofiltração sobre a viabilidade celular da linhagem HepG2 (24 h)-----	66
<i>Figura 21.</i> Microscopia de contraste de fase das células HepG2 incubadas por 1 hora com etanol (controle pareado) ou extrato hidroetanólico de resíduo da vitivinicultura concentrado por nanofiltração -----	69
<i>Figura 22.</i> Microscopia de contraste de fase das células HepG2 incubadas por 5 horas com etanol (controle pareado) ou extrato hidroetanólico de resíduo da vitivinicultura concentrado por nanofiltração -----	70
<i>Figura 23.</i> Microscopia de contraste de fase das células HepG2 incubadas por 24 horas com etanol (controle pareado) ou extrato hidroetanólico de resíduo da vitivinicultura concentrado por nanofiltração -----	72
<i>Figura 24.</i> Ensaio de apoptose por citometria de fluxo das células HepG2 incubadas por 24 horas com o extrato de resíduo da vitivinicultura concentrado por nanofiltração-----	74
<i>Figura 25.</i> Antimicina A oxida a sonda fluorescente DCFH-DA, mostrando-se aplicável aos ensaios de capacidade antioxidante celular -----	76
<i>Figura 26.</i> O extrato de resíduo da vitivinicultura concentrado por nanofiltração inibe a oxidação da sonda fluorescente DCFH-DA, no ensaio de capacidade antioxidante celular -----	77
<i>Figura 27.</i> Efeito antioxidante do extrato de resíduo da vitivinicultura concentrado por nanofiltração é mais potente na presença do pró-oxidante antimicina A, no ensaio celular de capacidade antioxidante nas células HepG2 -----	78
<i>Figura 28.</i> Efeito do extrato de resíduo da vitivinicultura concentrado por nanofiltração sobre a viabilidade celular da linhagem BEAS (5 h) -----	81
<i>Figura 29.</i> Efeito do extrato de resíduo da vitivinicultura concentrado por nanofiltração sobre a viabilidade celular da linhagem BEAS (24 h)-----	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classes dos compostos fenólicos encontrados em plantas.-----	24
Tabela 2. Fontes alimentares naturais de compostos fenólicos de plantas. -----	25
Tabela 3. Atividade anticâncer de compostos fenólicos. -----	40
Tabela 4. Condições de tratamento das células HepG2 com etanol e extratos bruto e concentrado.-----	49
Tabela 5. Valores do potencial antioxidante dos extratos. -----	53
Tabela 6. Valores da quantificação dos compostos bioativos presentes nos extratos.-----	55
Tabela 7. Valor da capacidade antioxidante celular do extrato concentrado.-----	80

LISTA DE ABREVIATURAS

µg - Micrograma

µL – Microlitro

µM - Micromolar

AAPH - *2,2'-azobis (2-metilpropionamida)*

ABTS - *2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazolina-6-ácido sulfônico)*

ACS - *American Cancer Society*

AlCl₃ - Cloreto de Alumínio

AM – Antocianinas Monoméricas

Ant. A – Antimicina A

AT – Antocianinas Totais

BEAS - Células de fibroblastos humanos

BSS - *Balanced Saline Solution*

CAC – Capacidade Antioxidante Celular

CAT – Capacidade Antioxidante Total

CO₂ – Dióxido de Carbono

CTB – *Cell Titer Blue*

CUPRAC - *Cupric Ion Reducing Antioxidante Capacity*

DCFH-DA- Diclorofluoresceína Diacetato

DMEM - *Dulbecco Modified Eagle Medium*

DNA - *Deoxyribonucleic acid*

DPPH - *2,2-difenil-1-picril-hidrazil*

EAG – Equivalentes de Ácido Gálico

EB – Extrato Bruto

EC – Extrato Concentrado

EC – Equivalentes de Catequina

EP – Erro Padrão

FeT – Fenólico Totais

FICT - Isotiocianato de Fluoresceína

FlaT – Flavonóides Totais

FRAP - *Ferric Ion Reducing Antioxidante Power*

g - Grama

h - Hora

HCl – Ácido Clorídrico

HepG2 – Células De Hepatocarcinoma Humano

Kg - Quilos

L - Litros

mg - Miligramas

mL - Mililitros

mM - Milimolar

MTT - Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]

NaNO₂ – Nitrito de Sódio

NaOH – Hidróxido de Sódio

nm - Nanometro

ORAC - *Oxygen Radical Absorbance Capacity*

PS - Fosfatidilserina

PI - Iodeto De Propídio

RNA - *Ribonucleic acid*

RNS – Espécie Reativa de Nitrogênio

ROO - Radical Peroxila

ROS – Espécie Reativa de Oxigênio

Rpm – Rotações por minuto

SFB – Soro Fetal Bovino

TEAC - *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*

TRAP - *Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter*

UVIBRA – União Brasileira da Vitivinicultura

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiv
1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1. VITIVINICULTURA: IMPORTÂNCIA ECONÔMICA, PRODUÇÃO DE VINHOS E SEUS RESÍDUOS	20
2.2. COMPOSTOS BIOATIVOS DE UVAS E DOS RESÍDUOS DA VITIVINICULTURA.....	22
2.2.1. Definição e classificação	22
2.2.2. Compostos fenólicos em uvas	26
2.2.3. Produção de extratos bioativos a partir de resíduos de uva	28
2.2.4. Propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos	29
2.2.5. Métodos de análise da capacidade antioxidante total e quantificação dos compostos fenólicos	31
2.2.5.1. <i>Ensaio Químico</i>	31
2.2.5.2. <i>Ensaio Celular</i>	34
2.2.6. Bioatividade de compostos fenólicos e doenças crônicas	36
2.2.6.1. <i>Ensaio celulares de acesso à bioatividade de compostos fenólicos</i>	37
2.2.6.2. <i>Compostos fenólicos e câncer</i>	39
3. OBJETIVOS	42
3.1. OBJETIVO GERAL.....	42
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
4. MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1. MATÉRIA PRIMA	43
4.2. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS	43
4.3. ENSAIOS QUÍMICOS	44
4.3.1. Métodos de análise da capacidade antioxidante total e quantificação de compostos fenólicos nos extratos de resíduo da uva	44
4.3.2. TEAC	45
4.3.3. ORAC	45
4.3.4. TRAP	46
4.3.5. Fenólicos Totais	46

4.3.6. Flavonóides Totais	47
4.3.7. Antocianinas totais e monoméricas	47
4.4. ENSAIO CELULAR	48
4.4.1. Cultivo Celular	48
4.4.2. Avaliação da viabilidade celular	48
4.4.3. Microscopia	50
4.4.4. Ensaio de apoptose	50
4.4.5. Ensaio de capacidade antioxidante celular (CAC)	51
4.4.6. Análises estatísticas	52
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1. ENSAIOS QUÍMICOS	53
5.1.1. Capacidade antioxidante total	53
5.1.2. Quantificação dos compostos fenólicos	55
5.2. ENSAIO CELULAR	58
5.2.1. Extrato bruto	58
5.2.1.1. <i>Viabilidade Celular</i>	58
5.2.1.2. <i>Microscopia</i>	60
5.2.2. Extrato Concentrado	62
5.2.2.1. <i>Viabilidade Celular</i>	62
5.2.2.2. <i>Microscopia</i>	68
5.2.2.3. <i>Ensaio de morte celular</i>	73
5.2.2.4. <i>Ensaio de Capacidade Antioxidante Celular (CAC)</i>	75
6. CONCLUSÕES	83
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a vitivinicultura ocupa aproximadamente 77 mil hectares de terras cultivadas, com vinhedos estabelecidos desde o extremo sul até regiões situadas muito próximas ao equador. Nos últimos anos, a vitivinicultura brasileira tem se tornado importante pela geração de empregos em grandes empreendimentos no setor. A produção brasileira de uvas de mesa e para a produção de vinhos em 2012 chegou a 696 mil toneladas. No mesmo ano, a produção de vinhos e derivados foi de aproximadamente 428 milhões de litros (UVIBRA, acesso em 14/11/2013).

O resíduo da indústria vinícola é composto principalmente por subprodutos sólidos, como o engaço e o bagaço, formado por semente e casca. Dados industriais indicam que para cada 100 L de vinho branco produzidos geram-se cerca de 32 kg de resíduos, dos quais 20 kg são de bagaço (Campos, 2005).

A semente da uva é composta aproximadamente de: 40% fibra, 16% óleo, 11% proteína, 7% compostos fenólicos complexos (taninos), açúcares, sais minerais e outros componentes minoritários. A casca da uva é uma fonte de compostos bioativos como antocianidinas e antocianinas, que são corantes naturais, possuem propriedades antioxidantes, são inibidores de lipoperoxidação e também apresentam atividade antimutagênica. Adicionalmente, a casca da uva contém resveratrol, outro composto com propriedades antioxidantes. O engaço, por sua vez, é rico em compostos tânicos, os quais apresentam alto potencial nutracêutico e farmacológico (Murga *et al.*, 2000).

Grande parte dos bagaços produzidos pelas vinícolas brasileiras ainda é descartada e parte é utilizada como adubo na agricultura familiar. Porém, o aproveitamento desses resíduos para outros fins é sobremaneira importante não só para reduzir o impacto ambiental, mas também para agregar valor aos mesmos. Neste contexto, a extração das substâncias bioativas dos resíduos, de importância para as indústrias farmacêuticas, químicas e de alimentos, é uma alternativa de potencial interesse tecnológico (Selani, 2010).

Os compostos bioativos mais comumente encontrados em frutas e hortaliças são as substâncias fenólicas, as quais são conhecidas como potentes antioxidantes e antagonistas naturais de patógenos. Estas substâncias encontram-se nos vegetais na forma livre ou ligadas a açúcares e proteínas. Agem como antioxidantes naturais e podem ser aplicados com finalidade de evitar a deterioração oxidativa dos alimentos, alternativamente aos antioxidantes artificiais. Além disso, podem exercer um importante papel fisiológico, minimizando os danos

oxidativos no organismo humano. A maioria das substâncias fenólicas pode ser classificada em dois principais grupos: os flavonóides e não-flavonóides. Os principais subgrupos dos flavonóides são as catequinas e proantocianidinas, as antocianidinas e os flavonóis ou flavonas (Cataneo *et al.*, 2008).

Muitos métodos são usados para medir as propriedades antioxidantes de alimentos vegetais e os mais comuns são aqueles que envolvem substâncias cromóforas e compostos radicais que promovem a formação de espécies reativas no meio. Os métodos mais utilizados são a redução dos radicais ABTS (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazolina-6-ácido sulfônico)) ou DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) e os ensaios de FRAP (*ferric ion reducing antioxidant power*) e ORAC (*oxygen radical absorbance capacity*). Estes métodos são populares devido à simplicidade e rapidez de execução e à sensibilidade (Ali *et al.*, 2008).

Embora os ensaios químicos sejam amplamente utilizados, a sua capacidade de prever a atividade *in vivo* dos compostos fenólicos é questionada por diversas razões. Algumas das razões estão relacionadas às condições do meio do ensaio, em temperatura e pH não fisiológicos. Além disso, a atividade biológica dos compostos depende, em grande parte, de sua biodisponibilidade e metabolismo. Desta forma, ensaios de bioatividade *in vitro* foram desenvolvidos com o objetivo de avaliar os potenciais efeitos benéficos dos compostos bioativos e prever seu comportamento em modelos de células humanas. Dentre esses ensaios, destaca-se o ensaio de capacidade antioxidante celular (CAC), desenvolvido por Wolfe e Liu (2007).

Muitos estudos indicam que o consumo habitual de frutas, vegetais e grãos integrais está inversamente associado com o risco de desenvolvimento de diferentes tipos de câncer, como intestino, mama. Possivelmente, o elevado teor de compostos bioativos, em especial os compostos polifenólicos, têm um papel importante neste cenário (Almeida *et al.*, 2011; Bakkalbasi *et al.*, 2005). A uva é uma excelente fonte de compostos fenólicos antioxidantes e tanto as uvas como os produtos a base de uva são alimentos que têm mostrado um potencial quimiopreventivo contra o câncer (Liu, 2009; 2010). Dado que os resíduos produzidos na vitivinicultura são muito ricos em diferentes compostos bioativos, a caracterização da atividade biológica de extratos produzidos a partir destes resíduos torna-se sobremaneira importante.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. VITIVINICULTURA: IMPORTÂNCIA ECONÔMICA, PRODUÇÃO DE VINHOS E SEUS RESÍDUOS

A história da vitivinicultura no Brasil começa em 1532, com os colonizadores portugueses na Capitania de São Vicente, onde hoje é o Estado de São Paulo. A partir deste ponto, a produção de uvas expandiu-se para outras regiões do país, sempre com cultivares de *Vitis vinifera* procedentes de Portugal e da Espanha. A partir do início do século XX a atividade vitivinícola expandiu-se para outras regiões do sul e sudeste do país, sempre em zonas com período hibernal definido. Entretanto, na década de 70, com a chegada de algumas empresas multinacionais na região da Serra Gaúcha e da Fronteira Oeste (município de Sant'Ana do Livramento), verificou-se um incremento significativo da área de parreirais com cultivares *V. vinifera* (Protas *et al.*, 2003).

Atualmente a produção de uvas e vinhos no Brasil está concentrada nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste, sendo uma atividade estável e com expressiva importância socioeconômica. Em 2011 a produção de uvas no Brasil foi de 709 mil toneladas, 25 % superior ao ano de 2010. A produção de vinho chegou a 305 milhões de litros em 2011. Aproximadamente 50% da produção nacional de uvas é destinada à elaboração de vinhos, sucos e outros derivados. Os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina respondem por 90 e 5%, respectivamente, da produção nacional de vinho, destacando-se como os maiores produtores. Em Santa Catarina, a vitivinicultura apresenta expressão econômica principalmente na região do Vale do Rio do Peixe, que possui grande similaridade com a região da Serra Gaúcha quanto à estrutura fundiária, topografia e tipo de exploração vitícola. A área média das propriedades dessa região é de aproximadamente 30 hectares (ha), sendo destes 2,1 ha com vinhedos. São propriedades com áreas acidentadas, nem sempre aproveitáveis integralmente para a agricultura (Rockenbach, 2008; UVIBRA, 2013).

No fluxograma simplificado do processo de fabricação de vinhos (Figura 1) pode-se identificar a produção do resíduo bagaço. Logo após a colheita e o transporte, as uvas são esmagadas e prensadas, originando o mosto. No caso da vinificação em branco, o bagaço é separado do mosto e dispensado antes da fermentação, que é a fase principal do processo de vinificação. Durante a fermentação, os açúcares presentes nas uvas são parcialmente oxidados a etanol sob a ação de leveduras selecionadas. Após 6 horas de fermentação em uma temperatura entre 25 °C e 30 °C, a fermentação encontra-se “tumultuosa” e é nessa etapa que

ocorre grande desprendimento de CO₂ e elevação da temperatura do meio. Na vinificação tinta, a separação do bagaço ocorre nessa fase. Em seguida inicia-se a etapa de fermentação lenta, onde os últimos traços de glicose são convertidos a etanol e outros produtos secundários da fermentação. Com o fim desta etapa, o mosto é transformado em vinho e, em seguida é feito o corte ou assemblagem, onde vinhos diferentes são separados e controlados pelo enólogo responsável pelo processo. Em seguida ocorre a maturação, que dura de 6 meses a 5 anos, que pode ocorrer em cubas de concreto, aço revestido, aço inoxidável ou barris (pipas) de carvalho, permanecendo em repouso para desenvolver suas propriedades sensoriais. Por fim se faz o engarrafamento e, a depender do vinho, pode ocorrer envelhecimento na garrafa com duração de 1 mês a diversos anos (Campos, 2005).

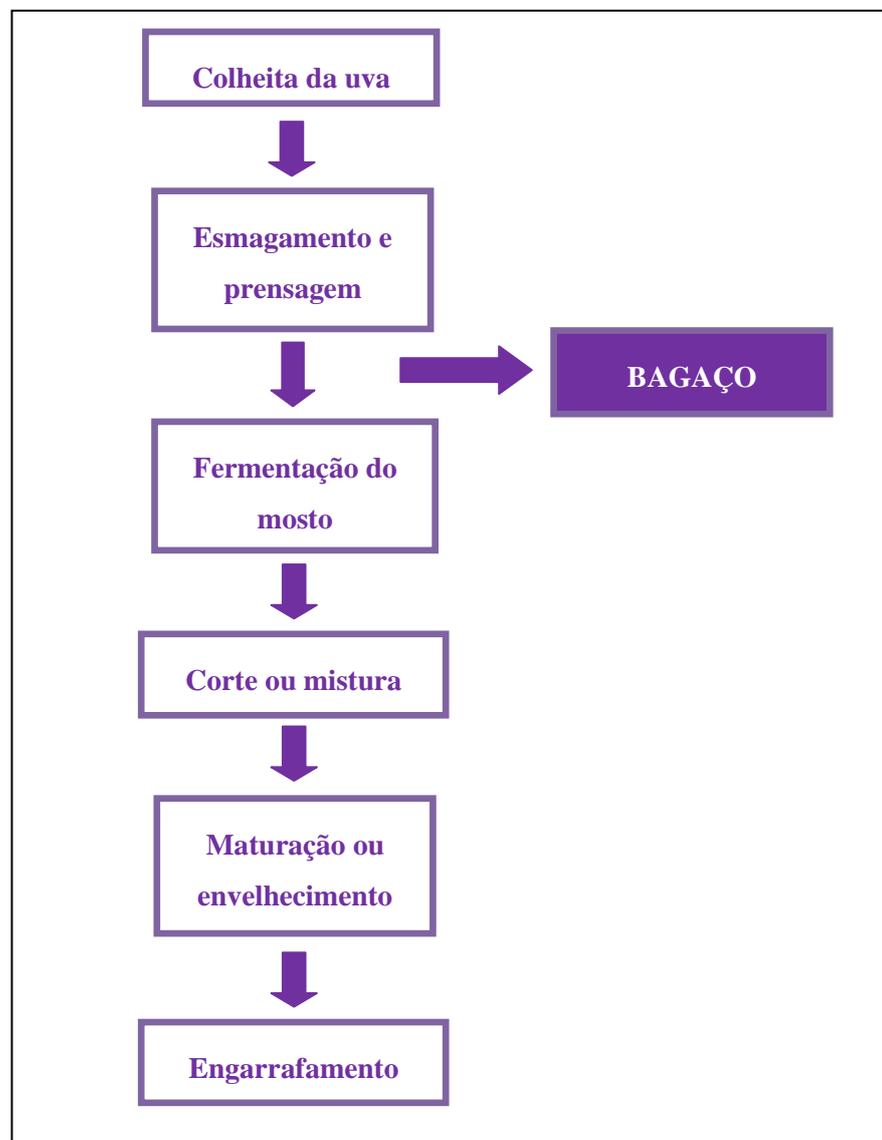


Figura 1. Fluxograma simplificado do processo de fabricação de vinho.

Dados estatísticos apontam que para cada 100 L de vinho produzidos são gerados cerca de 32 kg de resíduos, dos quais 20 kg são de bagaço na produção de vinho branco e 15 kg na produção de vinho tinto. A quantidade de resíduos gerados pelas vinícolas brasileiras chega próximo a 6 milhões de toneladas por ano. O bagaço é o principal subproduto da vinificação, resultado da prensagem das uvas, constituído principalmente pelas cascas, semente e engaços (Lafka *et al.*, 2007). Devido ao conteúdo elevado de substâncias orgânicas, tais como açúcares, taninos, polifenóis, poliálcoois, pectinas e lipídeos, apresenta elevado impacto ambiental. Na tentativa de amenizar os danos causados pelo descarte indevido do resíduo, alguns produtores usam o bagaço como adubo ou ração para animais, porém seu baixo valor nutricional e alto teor de compostos fenólicos limitam o uso do bagaço para estes fins. Portanto, torna-se clara a importância de estudos voltados para a caracterização química detalhada do bagaço, o que possibilitaria a busca de novas formas de aproveitamento deste resíduo. Tanto a casca como a semente mostram-se ricas em compostos polifenólicos (Cruz, 2013; Arnous & Meyer, 2008. Kim *et al.*, 2006), sugerindo o potencial do bagaço da uva em apresentar propriedades bioativas e nutracêuticas.

2.2. COMPOSTOS BIOATIVOS DE UVAS E DOS RESÍDUOS DA VITIVINICULTURA

2.2.1. Definição e classificação

Os compostos bioativos, em geral, são produzidos por plantas e apresentam efeitos farmacológicos ou toxicológicos. Apesar de outros nutrientes apresentarem os mesmos efeitos quando ingeridos em altas concentrações (por exemplo, vitaminas e minerais), estes não são listados como compostos bioativos. Os compostos bioativos típicos provenientes das plantas são produtos de metabolismo secundário. Portanto, a definição para compostos bioativos de plantas é que são metabólitos secundários que produzem efeitos farmacológicos ou toxicológicos em humanos e animais (Bernhoft, 2010). Todo organismo vivo processa diversos compostos químicos para sua sobrevivência e subsistência, e todos esses compostos podem ser divididos em duas classes. Uma é a dos metabólitos primários, que são substâncias químicas que visam o crescimento e o desenvolvimento, como os carboidratos, aminoácidos, proteínas e lipídeos. Outra é a dos metabólitos secundários, que é um grupo de compostos que são produzidos frequentemente na fase subsequente ao crescimento, não têm função de auxiliar no crescimento, têm estruturas químicas incomuns e muitas vezes são formados como misturas de diferentes compostos relacionados a uma mesma família química (Azmir, *et al.*,

2013). Compostos bioativos também podem ser definidos como qualquer substância que impede, previne e/ou remove o dano oxidativo de uma molécula-alvo (Halliwell, 2007). Khlebnikov *et al.* (2007) definem estes compostos como qualquer substância que diretamente elimina espécies reativas de oxigênio (do inglês, ROS – *reactive oxygen species*) ou age indiretamente regulando a defesa antioxidante ou inibindo a produção de ROS.

Compostos bioativos em alimentos têm atraído interesse desde os anos 90, devido à alta frequência de evidências acerca de seus efeitos benéficos na saúde humana. O interesse foi estimulado principalmente por estudos epidemiológicos que indicaram uma associação inversa entre o consumo de alimentos ricos nestes compostos e a prevalência de doenças crônicas não-transmissíveis, tais como câncer, doenças cardiovasculares e diabetes mellitus (D'Archivio *et al.*, 2010). Muitos estudos indicam que alimentos ricos em compostos antioxidantes, como frutas frescas, vegetais e chás, têm efeito protetor contra doenças causadas pela produção em excesso de ROS, como câncer, artrite reumatóide, assim como processos degenerativos relacionados à idade, incluindo doença de Parkinson e Alzheimer. Esta proteção foi parcialmente atribuída à presença de diversos componentes como vitaminas, flavonóides, antocianinas e outros compostos fenólicos, sendo as propriedades antioxidantes a principal característica dessas substâncias (Ali *et al.*, 2008; Almeida *et al.*, 2011). Os ROS são moléculas altamente reativas que são nocivas e prejudiciais para nossas células, que combinadas com outros fatores, como a idade, contribuem para a ocorrência de doenças crônicas. As células são danificadas por reações em cadeia causadas pela oxidação promovida pelos ROS. Os compostos antioxidantes são capazes de prevenir ou reduzir a taxa de oxidação de biomoléculas (lipídios, proteínas e ácidos nucleicos) e dessa forma inibir a patogênese de certas doenças (Liu, 2009).

Os compostos bioativos ocorrem naturalmente em pequenas quantidades em vegetais e produtos alimentícios (Kris-Etherton *et al.*, 2002). Esses compostos podem ser divididos em três principais classes: (a) terpenos, (b) alcalóides e (c) compostos fenólicos (Croteau *et al.*, 2000). Os compostos fenólicos são os mais estudados e apresentam capacidade antioxidante elevada, tem um papel muito importante para a bioatividade e para a qualidade sensorial de frutas, vegetais e outras plantas (Einbond *et al.*, 2004; Rockenbahc *et al.*, 2011).

Estruturalmente, os compostos fenólicos possuem um anel aromático, tendo um ou mais substituintes hidroxila e podem variar de uma molécula simples a um composto altamente polimerizado (Balasundram *et al.*, 2006). Polifenóis estão divididos dentro de várias classes, de acordo com o número de anéis de fenol e dos elementos estruturais que

ligam esses anéis uns aos outros (Ignat *et al.*, 2011). As diferentes classes de polifenóis estão mostradas na Tabela 1.

Tabela 1. Classes dos compostos fenólicos encontrados em plantas.

Classes	Estrutura química simplificada
Fenólicos simples, Benzoquinonas	C6
Ácidos hidroxibenzóicos	C6-C1
Acetofenonas, Ácidos fenilacéticos	C6-C2
Ácidos hidroxicinâmico, Fenilpropanóides	C6-C3
Naptoquinonas	C6-C4
Xantonas	C6-C1-C6
Estilbenos, Antraquinonas	C6-C2-C6
Flavonóides, Isoflavonóides	C6-C3-C6
Lignanas, Neolignanas	(C6-C3) ₂
Biflavonóides	(C6-C3-C6) ₂
Ligninas (polímeros)	(C6-C3) _n
Taninos condensados (oligômeros ou polímeros)	(C6-C3-C6) _n

Fonte: Balasundram *et al.* (Food Chemistry, v. 99, p.191-203, 2006).

Em termos quantitativos, os principais grupos de polifenóis são: flavonóides, ácidos fenólicos, taninos (hidrolisáveis e condensados), estilbenos e lignanas (Ignat *et al.*, 2011), distribuídos em grande variedade de fontes alimentares (Tabela 2).

Tabela 2. Fontes alimentares naturais de compostos fenólicos de plantas.

Compostos fenólicos	Fontes alimentares
<i>Ácidos fenólicos</i>	
Ácidos hidroxicinâmicos	Cenoura, cereais, pêra, cerejas, frutas cítricas, sementes oleaginosas, pêssegos, ameixas, espinafre, tomate e berinjela
Ácidos hidroxibenzóicos	Cereais e oleaginosas
<i>Flavonóides</i>	
Antocianinas	Amoras, cerejas, uvas e morangos
Flavonas	Frutas cítricas, aipo, salsa e espinafre
Flavonóis	Maçãs, feijão, amoras, alface, cebola, azeitona, pimentão, tomates e trigo
Flavanonas	Frutas cítricas
Flavanóis	Maçãs, uvas, cebola e alface
Isoflavonas	Soja
Xantonas	Manga
<i>Taninos</i>	
Condensados	Maçãs, uvas, pêssegos e pêra
Hidrolisáveis	Romã e framboesa

Fonte: Naczk & Shahidi (Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 41, p. 1523–1542, 2006).

2.2.2. Compostos fenólicos em uvas

A concentração de compostos fenólicos em uvas depende da variedade da uva e é influenciada pela forma como a mesma é cultivada e por fatores ambientais (Montealegre *et al.*, 2006). Muitos estudos apontam que uvas e vinhos contêm concentrações elevadas de compostos fenólicos, sendo principais os flavonóides, que estão nas cascas e sementes (Figura 2) e os principais flavonóides presentes em uvas tintas são flavanóis, flavonóis e antocianinas (Figura 3).

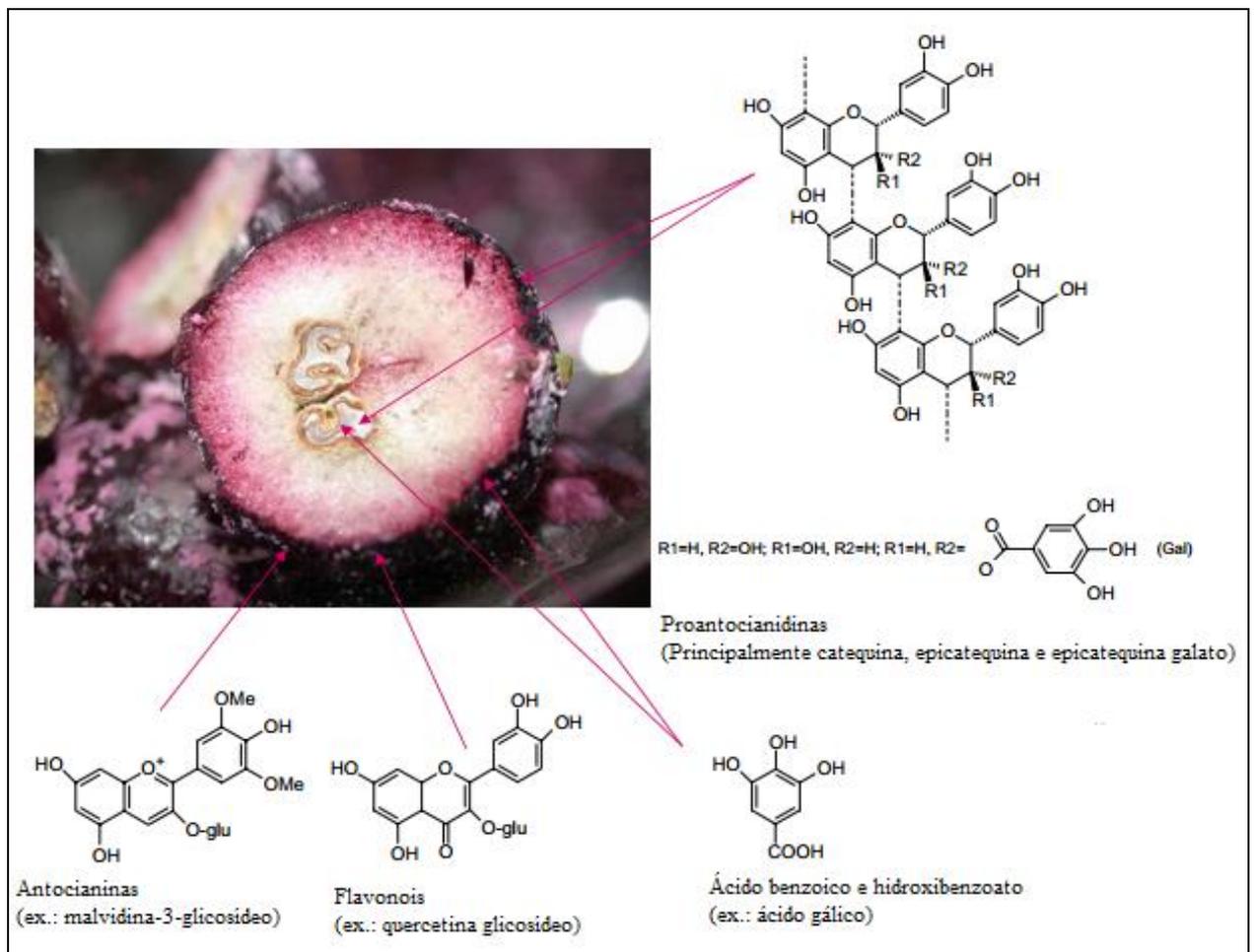


Figura 2. Imagem de corte transversal da uva tinta. Na foto distinguem-se a casca, polpa e sementes.

Fonte: Pinelo *et al.* (Trends in Food Science & Technology, v. 17, p. 579-590, 2006).

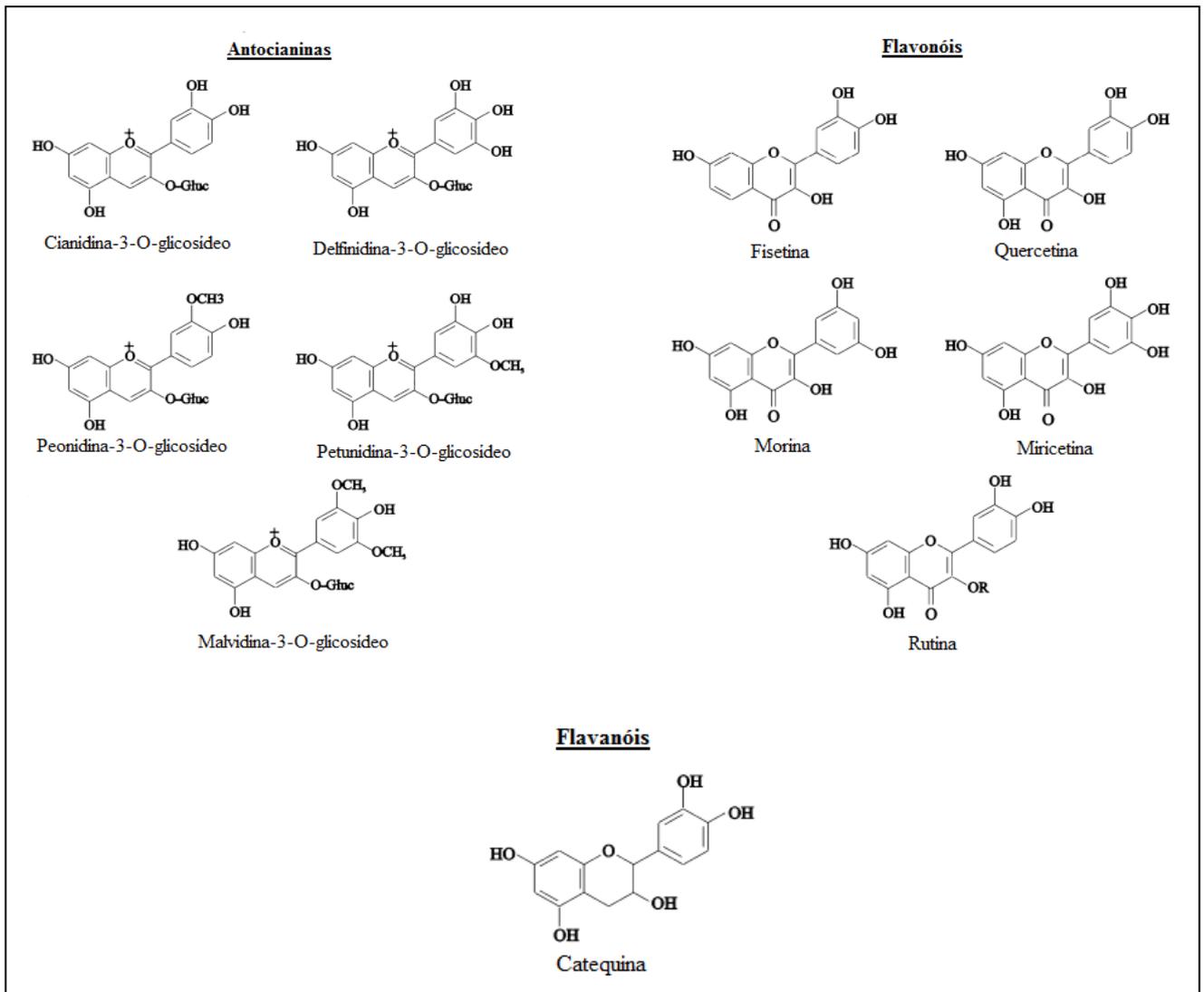


Figura 3. Estrutura química de flavonóides selecionados. Fonte: Novak *et al.* (Analytica Chimica Acta, v. 630, p. 107-115, 2008).

A semente apresenta uma concentração de flavanóis mais elevada comparada à casca, sendo a catequina o flavanol mais abundante. Os flavonóis estão presentes na casca exclusivamente na forma de 3-O-glicosídeos, sendo a quercetina o composto mais abundante. Outras formas glicosídicas têm sido identificadas, como a miricetina e o kaempferol (Castillo-Muñoz *et al.*, 2009; Castillo-Muñoz *et al.*, 2007). Um dos maiores grupos de flavonóides que é encontrado em uvas e vinho são as antocianinas, sendo a malvidina-3-O-glicosídeo a forma mais abundante. As antocianinas estão presentes, exclusivamente, na parede celular e vacúolos da casca da uva e são diretamente responsáveis pela coloração das uvas e dos vinhos tintos (Novak *et al.*, 2008).

2.2.3. Produção de extratos bioativos a partir de resíduos de uva

A maior parte dos compostos fenólicos encontrados em vinho, suco de uva e seus derivados pode agir como antioxidantes. Da mesma forma, os resíduos provenientes da fabricação do vinho também são caracterizados pelo alto teor de compostos fenólicos devido à uma incompleta extração durante a produção de vinho. Em extratos de uva podem-se encontrar antocianinas na casca da fruta e procianidinas nas sementes (Yildimirim *et al.*, 2005; Shrikhande, 2000). A distribuição dos fenólicos totais extraíveis da uva fresca é de aproximadamente 10% na polpa, 60 -70% nas sementes e 28 -35% na casca (Shi *et al.*, 2003).

Uma atenção especial está focada na extração de compostos fenólicos a partir de fontes de baixo custo ou de resíduos do processamento das agroindústrias. O bagaço da uva obtido após o processo de fabricação do vinho é uma boa fonte de compostos fenólicos bioativos (Bucic-Kojic *et al.*, 2013). A extração dos compostos fenólicos provenientes de fontes alternativas é o passo mais importante para seu isolamento, identificação e utilização (Bucic-Kojic *et al.*, 2007). Esses compostos podem ser usados na preparação de suplementos alimentares ou nutracêuticos, ingredientes alimentares, farmacêuticos e cosméticos (Dai & Mumper, 2010).

A extração com solvente e a extração com fluido supercrítico são as técnicas mais comumente utilizadas para isolar os compostos fenólicos e preparar os extratos a partir de materiais vegetais, devido à facilidade de uso, eficiência e ampla aplicabilidade (Bucic-Kojic *et al.*, 2007). Muitos estudos relatam que os compostos fenólicos têm sido extraídos por moagem, secagem ou liofilização de frutas, hortaliças e ervas ou apenas pela extração com solvente. Esses processos promovem a co-extração de substâncias não fenólicas, como por exemplo, açúcares, ácidos orgânicos e proteínas, sendo necessária purificação subsequente (Merken & Beecher, 2000; Castañeda-Ovando *et al.*, 2009).

Na extração líquido-líquido, o solvente apresenta afinidade preferencial ou seletividade por um ou mais componentes do alimento. Dois resultados são obtidos desse contato: o extrato, que é a solução rica contendo os compostos fenólicos extraídos, e a solução de alimentação com compostos fenólicos residuais. Para obter um melhor resultado na extração, é necessário escolher o solvente adequado para a amostra. Para a separação de compostos fenólicos, a extração líquido-líquido é frequentemente usada com subproduto líquido industrial, resultante da indústria de bebidas (Ignat *et al.*, 2011).

A extração sólido-líquido é a operação unitária usada extensivamente para recuperar muitos componentes importantes dos alimentos, como: sacarose da cana de açúcar ou beterraba, lipídios a partir de sementes oleaginosas, fitoquímicos de plantas, compostos fenólicos de plantas, frutas e legumes. Neste tipo de extração muitos fatores podem afetar a concentração de compostos fenólicos no extrato, como: temperatura, razão líquido-sólido, vazão e o tamanho das partículas. Os solventes comumente usados são o metanol ou etanol acidificado. O metanol se mostra mais eficaz na extração de compostos fenólicos, porém devido à sua toxicidade, na indústria alimentícia, a preferência é o uso de etanol (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009; Kapasakalidis *et al.*, 2006; Lapornik *et al.*, 2005).

Outro método é a extração com fluido supercrítico, que pode ser uma alternativa benéfica ao meio ambiente, pois o uso de solventes tóxicos é menor, além de ser um método rápido, automático, seletivo, ocorre na ausência de luz e ar, que durante a extração, nos procedimentos tradicionais, acelera a degradação de compostos de interesse. O fluido supercrítico mais usado tem sido o dióxido de carbono, por ser ambientalmente seguro, pois ele possui baixa toxicidade, não é inflamável e tem compatibilidade com os alimentos processados. No entanto, estudos apontaram que este não é o melhor método para a extração de antocianinas, pois requer o uso de outro solvente orgânico, metanol ou etanol, em porcentagem elevada, e este fator parece limitar o uso da extração por fluido supercrítico para estes compostos (Bleve *et al.*, 2008).

Há outros métodos usados na extração de compostos bioativos, que fazem uso de aquecimento, ebulição ou refluxo, que são métodos convencionais, porém apresentam as desvantagens de perda de polifenóis devido à ionização, hidrólise e oxidação. A extração dos compostos fenólicos por meio de enzimas se mostrou eficaz, porém é necessária uma alta concentração enzimática para viabilizar a degradação da parede celular, o que eleva o custo do processo (Maier *et al.*, 2008; Ignat *et al.*, 2011).

2.2.4. Propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos

Um composto que possui propriedades antioxidantes pode prevenir a oxidação de materiais oxidáveis por eliminação das espécies reativas e por diminuir o estresse oxidativo. O estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e/ou nitrogênio (ROS/RNS), e a capacidade do sistema antioxidante endógeno, causando a oxidação de várias moléculas, como por exemplo, enzimas, proteínas, DNA e lipídios (Figura 4). O estresse oxidativo leva à oxidação das lipoproteínas de baixa densidade

(LDL), pode causar uma série de doenças em humanos como câncer, doenças cardíacas, esclerose múltipla, doença autoimune e Parkinson (Haminiuk *et al.*, 2012; Lu & Foo, 1999). As propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos podem ser mediadas pelos seguintes mecanismos: eliminação de espécies de radicais como ROS/ RNS, pela supressão da formação de ROS/ RNS por algumas enzimas ou pela quelatação de metais traços envolvidos na produção de radicais livres ou regulando ou protegendo a defesa antioxidante.

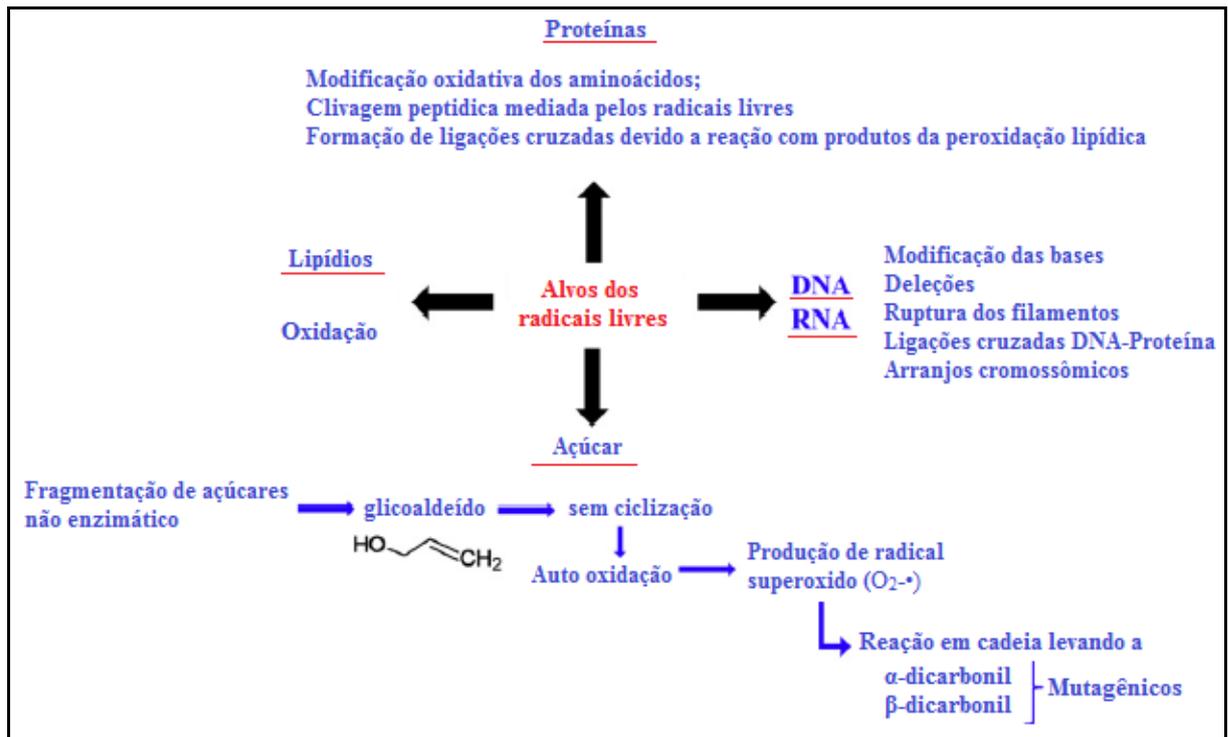
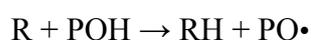


Figura 4. Alvos das espécies reativas de oxigênio. Adaptado de Carochó & Ferreira (Food and Chemical Toxicology, v. 51, p. 15-25, 2013).

Os compostos fenólicos possuem uma estrutura química ideal para eliminar ROS por possuírem (a) grupos hidroxilas que estão propensos à doar um átomo de hidrogênio ou um elétron a um radical livre; e (b) um sistema aromático conjugado estendido para deslocar um elétron não emparelhado. Os compostos fenólicos (POH) agem como receptores de radicais livres e quebram cadeias. Eles interferem na oxidação dos lipídios e de outras moléculas por uma rápida doação de um átomo de hidrogênio para o radical (R):



Os radicais fenoxi intermediários (PO•) são relativamente estáveis, devido à ressonância e, portanto uma nova reação em cadeia não iniciada facilmente. Além disso, os

radicais fenoxi intermediários também atuam como terminadores da propagação através da reação com outros radicais livres (Dai & Mumper, 2010).



Devido à diversidade química dos compostos fenólicos e à complexidade da composição de amostras das plantas, é caro e ineficiente separar cada antioxidante fenólico e estudá-los individualmente. Como os antioxidantes possuem diversos modos de ação, frequentemente mais de um mecanismo está envolvido, causando sinergismo. Neste contexto, a análise da capacidade antioxidante total de uma amostra reflete os benefícios potenciais da ação cooperativa dos compostos. Portanto, é necessário estabelecer métodos eficazes para analisar a capacidade antioxidante das amostras de extratos fenólicos.

2.2.5. Métodos de análise da capacidade antioxidante total e quantificação dos compostos fenólicos

2.2.5.1. Ensaios Químicos

Uma grande variedade de métodos químicos *in vitro* são utilizados atualmente para avaliação da capacidade antioxidante total (CAT) tais como o *Trolox equivalent antioxidant capacity* (TEAC), *Oxygen radical antioxidant capacity* (ORAC), *Total radical-trapping antioxidant parameter* (TRAP), *Ferric ion reducing antioxidante power* (FRAP) e *Cupric ion reducing antioxidante capacity* (CUPRAC). Com base na reação química envolvida, os principais ensaios de capacidade antioxidante são baseados na transferência de átomo de hidrogênio e/ou transferência de um elétron (Moure *et al.*, 2001; Dai & Mumper, 2010; Huang *et al.*, 2005).

Os ensaios baseados na transferência de elétron envolvem uma reação redox com o oxidante (também com a sonda para monitoramento da reação) como um indicador do final da reação. A maioria dos ensaios baseados na transferência de hidrogênio monitora a reação cinética, e os resultados são obtidos por meio das curvas cinéticas. Os ensaios TEAC, FRAP e CUPRAC são ensaios baseados na transferência de elétron. Estes métodos medem a capacidade de um antioxidante prevenir a oxidação de uma substância oxidável ou em reduzir um radical livre, e a capacidade antioxidante é acompanhada pela mudança de cor em um espectrofotômetro. A reação está completa quando a mudança de cor estabiliza. O grau da mudança de cor é proporcional à concentração do antioxidante. As sondas usadas nos ensaios

são 2,2'-azinobis (3-ethylbenzotiazolona-6-ácido sulfônico) cátion radical $ABTS^{\bullet+}$ no TEAC, Fe^{3+} (2,4,6-tripiridil-s-triazina) $_2Cl_3$ no FRAP e bis(neocuproina) $Cu^{2+}Cl_2$ no CUPRAC.

O método TEAC é simples, reprodutível e de baixo custo, e é usado para avaliar amostras hidrofílicas ou lipofílicas. Para executar o ensaio de TEAC, o radical $ABTS^{\bullet+}$ necessita ser formado por oxidação do ABTS com o persulfato de potássio. O radical formado é solúvel em água e em solventes orgânicos e absorve luz no intervalo de 600 – 750 nm. O $ABTS^{\bullet+}$, de cor esverdeada, é reduzido a ABTS no ensaio de TEAC, de acordo com a quantidade de antioxidante no meio reacional. Os resultados são expressos em equivalentes do Trolox, um padrão antioxidante submetido às mesmas condições de análise (Ou *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2005; Re *et al.*, 1999; Tiveron, 2010). A reação que ocorre em TEAC está representada na Figura 5.

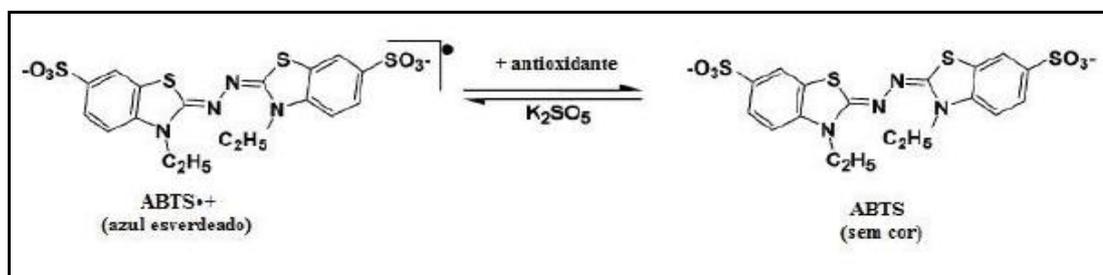
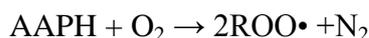
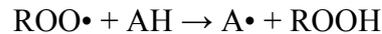


Figura 5. Redução do $ABTS^{\bullet+}$ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio (adaptado de Tiveron, 2010).

Os ensaios baseados na transferência de átomo de hidrogênio (HAT) incluem os ensaios ORAC e TRAP, que acessam a capacidade de um antioxidante em eliminar radicais livres pela doação de átomo de hidrogênio. Esses métodos avaliam a capacidade de uma amostra em inibir o consumo de uma molécula alvo, mediada por radicais peróxidos. Normalmente, o composto AAPH (2,2'-azobis (2-metilpropionamidina) hidrocloreto, também abreviado como ABAP) é usado como fonte de radical peróxila (ROO^{\bullet}), que gera uma taxa conhecida de ROO^{\bullet} nas primeiras horas de incubação em meio aquoso, como podemos observar na equação abaixo:



A incubação de AAPH com a molécula alvo (MA) leva a mudança na absorbância de luz ou na intensidade da fluorescência da molécula alvo. Desta forma, a incubação da molécula alvo, o AAPH e o antioxidante puro ou uma mistura complexa (AH) geralmente leva a inibição do consumo da MA. As reações básicas envolvidas nestes ensaios são:



O ensaio TRAP é baseado na captação do oxigênio associado ao processo de peroxidação da amostra. O método avalia o período de indução gerado pelo perfil cinético da captação do oxigênio durante a incubação da amostra com o AAPH (López-Alarcón & Denicola, 2013).

O método ORAC consiste em medir a diminuição da fluorescência de uma sonda (por exemplo, a fluoresceína – 3',6'-dihidroxipiro(isobenzofurano-1[3H], 9'[9H]-xanten)-3-one)) com um resultado da perda de sua conformação ao sofrer danos oxidativos causados por uma fonte de radicais peroxila ($\text{ROO}\cdot$). Neste ensaio, a capacidade antioxidante é avaliada a partir da área abaixo da curva do perfil cinético do consumo da molécula alvo ou sonda. Os valores para a área abaixo da curva são comumente comparados com o ácido gálico ou Trolox, permitindo determinar os resultados de ORAC com base nos compostos padrão (Zulueta *et al.*, 2009). A Figura 6 apresenta a reação do radical AAPH durante o ensaio de ORAC.

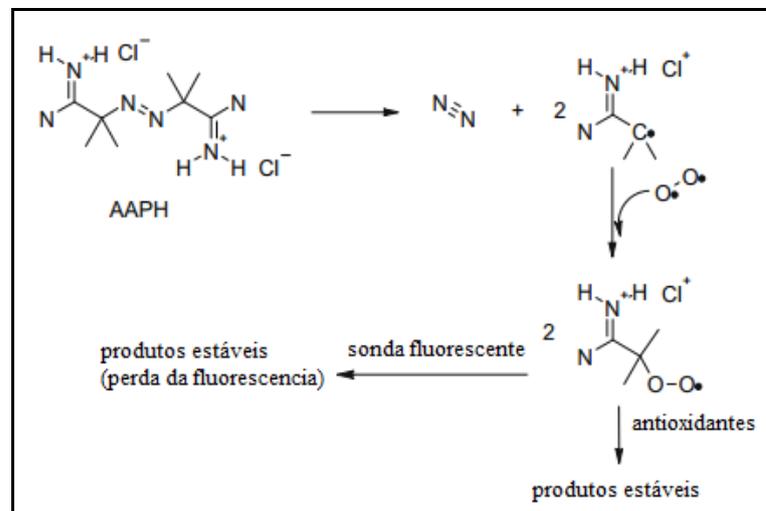


Figura 6. Reação do radical AAPH durante o ensaio de ORAC (adaptado de Zulueta *et al.* Food Chemistry, v.114, p. 310-316, 2009).

A quantificação dos compostos fenólicos totais pode ser feita pelo método que utiliza o reagente Folin-Ciocalteu. Este método baseia-se na redução dos ácidos fosfotúngstico ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) e fosfomolibdico ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$), presentes no reagente de Folin-Ciocalteu, pelos compostos fenólicos presentes na amostra, o óxido de tungstênio (W_8O_{23}) e óxido de molibdênio (Mo_8O_{23}) em meio alcalino, como demonstrado na reação abaixo:



Os óxidos formados pela reação apresentam coloração azulada, tornando possível a quantificação da absorvância da solução na região do visível, a 760 nm. Para a quantificação, é necessário fazer uma curva de calibração com o ácido gálico, através desta curva é possível correlacionar a intensidade da cor à concentração de fenóis presentes na amostra, o resultado é expresso em equivalentes de ácido gálico (GAE) (Tiveron, 2010).

A diversidade química dos flavonóides e a disponibilidade limitada de padrões autênticos dificulta a determinação de flavonóides totais usando técnicas separadas. Por este motivo, os métodos baseados na medição direta ou indireta por espectrofotometria são usados normalmente. Um método descrito por Zhishen *et al.* (1999) para determinar o teor de flavonóides totais é baseado na reação dos flavonóides com o sistema cromogênico NaNO_2 - Al(III) - NaOH . Os compostos flavonóides reagem com o ácido nitroso, formando um complexo de flavonóides nitrosos com o íon de alumínio. Logo após a adição de uma solução alcalina, é gerada a produção de complexos que dão a cor avermelhada à solução, esses complexos são formados por íons de alumínio e nitrosfenol e a absorvância é medida no comprimento de onda de 510 nm. Devido à sua simplicidade, este método tem sido usado para estimar o teor de flavonóides totais em frutas (Zhishen *et al.*, 1999; Magalhães *et al.*, 2012).

As antocianinas podem ser avaliadas quimicamente e quantificadas em função do pH da solução. Um dos métodos usados para a quantificação das antocianinas é o de pH diferencial, que permite a quantificação das antocianinas totais e monoméricas, pelo seu comportamento em condições de pH distintas. A amostra é exposta a dois tampões com pH 1,0 e 4,5. As soluções tem suas absorvâncias determinadas em dois comprimentos de onda, 700 nm e o comprimento de máxima absorção que pode variar de 510 a 550 nm em função das antocianinas presentes na amostra (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009; Cruz, 2008).

2.2.5.2. *Ensaio Celular*

Os ensaios químicos *in vitro* são amplamente usados para determinar o potencial antioxidante da amostra. Porém, os resultados dos ensaios químicos não representam a atividade biológica dos compostos presentes nas amostras, dado que os ensaios químicos são realizados em pH e temperatura não fisiológicos e não consideram sua biodisponibilidade, absorção e metabolismo. Devido a estas limitações, o ensaio de capacidade antioxidante celular (CAC) tem sido utilizado para avaliar a ação antioxidante desses compostos em

modelos celulares (López-Alarcón & Denicola, 2013; Wolfe & Liu, 2007; Zhang *et al.*, 2013).

O primeiro ensaio celular foi desenvolvido por Wolf e Liu. Este ensaio foi realizado com células de Hepatocarcinoma humano, HepG2, a mesma linhagem utilizada no presente estudo, avalia a prevenção da oxidação da sonda fluorescente intracelular diclorofluoresceína exercida pelos compostos bioativos/antioxidantes da amostra de interesse mediante um desafio pró-oxidativo, conforme descrito na Figura 7 (Blasa *et al.*, 2011).

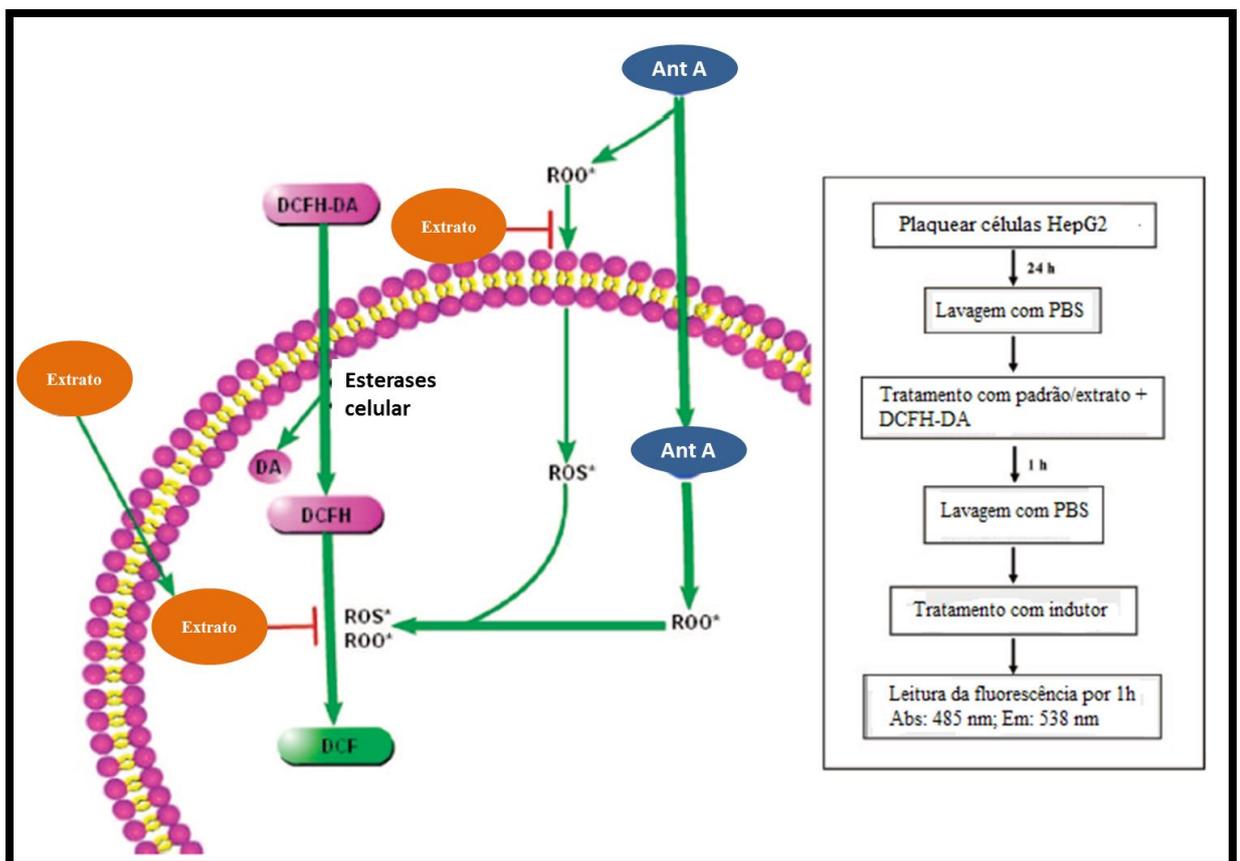


Figura 7. Representação esquemática da metodologia e do princípio proposto do ensaio de CAC. As células HepG2 foram pré-tratadas com os extratos de resíduos da uva e DCFH-DA (diacetato de diclorofluoresceína). DCFH-DA (não fluorescente) difunde-se através da membrana celular até o meio intracelular, onde sofre ação de enzimas esterases que promovem o “trapeamento” da sonda (DCFH). Antimicina A (Ant A) foi utilizada como agente indutor, pois é capaz de difundir-se para dentro das células e, através da inibição da atividade do Complexo III da cadeia transportadora de elétrons, leva ao aumento da produção de ROS. ROS promovem a oxidação de DCFH em DCF, que é fluorescente. Como mostrado na figura, os antioxidantes diminuem, potencialmente, a quantidade de espécies reativas e também previnem a oxidação de DCFH. O ensaio original utilizou ABAP como indutor da produção de ROS (Adaptado de Wolfe & Liu, 2007).

As células HepG2 (Figura 8), uma linhagem derivada de hepatocarcinoma humano, é amplamente utilizada em estudos bioquímicos e nutricionais por ser considerada um dos modelos experimentais que mais se aproximam dos hepatócitos humanos em cultura, apesar de sua origem cancerosa. Estas células transformadas crescem continuamente, permitindo o estudo de fatores que agem na antiproliferação (Alía *et al.*, 2006). De fato, a metodologia para avaliação da capacidade antioxidante celular promovida por compostos bioativos de alimentos vegetais foi primeiramente desenvolvida neste modelo de células (Wolfe e Liu, 2007).

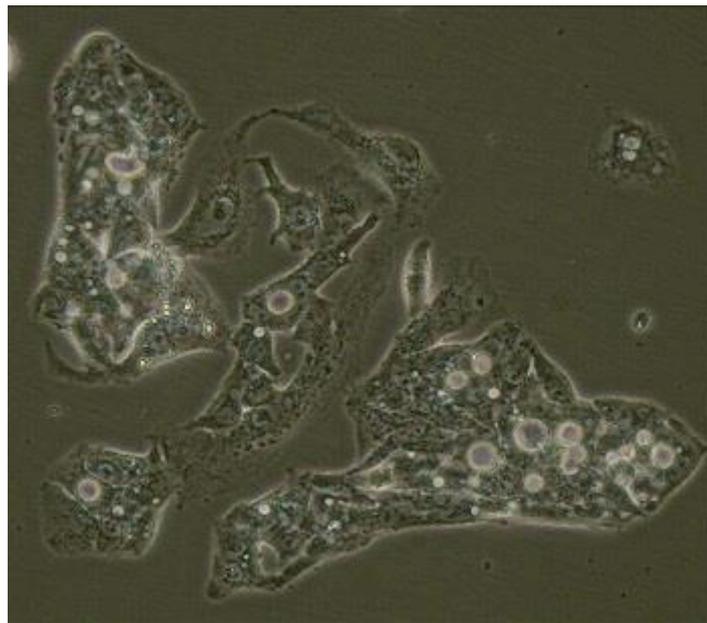


Figura 8. Microscopia de contraste de fase das células HepG2. A fotografia foi registrada em microscópio invertido (Olympus CKX41) e câmera digital Q-Color 5 (Olympus). Aumento de 200 ×.

A vantagem de utilizar cultura de células para avaliar a capacidade antioxidante de compostos fenólicos é poder testar diferentes tipos de fatores de estresse e diferentes modelos celulares (Niki, 2010). O ensaio de CAC é uma importante ferramenta para classificação da atividade antioxidante de extratos de produtos naturais que avaliam o potencial exercido pela resposta antioxidante ao nível celular e não apenas por sua capacidade como agente redutor. Desta forma, o ensaio de CAC se torna um método complementar na análise do potencial antioxidante de compostos fenólicos extraídos de fontes naturais.

2.2.6. Bioatividade de compostos fenólicos e doenças crônicas

Nos últimos anos, o interesse em compostos fenólicos aumentou devido aos seus efeitos benéficos à saúde humana, pois além de suas propriedades antioxidantes, como já

mencionadas, esses compostos apresentam potenciais efeitos anticâncer, anti-inflamatório, cardioprotetor e antienvhecimento (Hogan *et al.*, 2009; Xia *et al.*, 2010).

Estudos mostram que extratos ricos em polifenóis podem funcionar como agentes cardioprotetores pelo fato de reduzirem a adesão e agregação de plaquetas induzida por hipercolesterolemia e reduzirem a geração de ânion superóxido (Shanmuganayagam *et al.*, 2007). O efeito de extratos mostrou ser maior do que o efeito dos compostos isolados, indicando efeitos sinérgicos de diferentes compostos fenólicos (Tsang *et al.*, 2005; Olas *et al.*, 2008). Especificamente, já foi mostrado em modelo animal, que compostos fenólicos provenientes de extratos de uvas inibem lesões induzidas por isquemia-reperfusão, aumentam a capacidade antioxidante do plasma e a concentração da lipoproteína HDL, contribuindo para a melhora do quadro de dislipidemia e, portanto, reduzindo o risco de desenvolvimento de doenças coronárias (Falchi *et al.*, 2006).

As propriedades anti-inflamatórias dos compostos fenólicos foram sugeridas devido ao fato de apresentarem efeitos semelhantes aos da indometacina, um fármaco anti-inflamatório conhecido, já tendo sido descritas em modelos animais e em humanos (Chacón *et al.*, 2009; Panico *et al.*, 2006; Terra *et al.*, 2009; Bralley *et al.*, 2007). Adicionalmente, compostos fenólicos provenientes de uvas são capazes de reduzir os danos oxidativos do DNA, sugerindo que apresentam propriedade antienvhecimento (Shukitt-Hale *et al.*, 2006; Balu *et al.*, 2006; Balu *et al.*, 2005).

2.2.6.1. *Ensaio celular de acesso à bioatividade de compostos fenólicos*

Ensaio de viabilidade celular

Vários métodos são utilizados para avaliar a viabilidade de células em cultura, sendo a grande maioria baseada na determinação de sua atividade metabólica. Um dos métodos utilizados para avaliar a viabilidade celular é o método baseado na redução do reagente MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]). O MTT, que é solúvel em água e que apresenta coloração amarela, é um composto que, uma vez adicionado às culturas, sofre redução por desidrogenases celulares ativas, formando um cristal de coloração roxa, formazan, que pode ser solubilizado e quantificado espectrofotometricamente (Figura 9). Dado que a mitocôndria é o principal sítio das enzimas desidrogenases, a redução do MTT a formazan será diretamente proporcional à atividade mitocondrial e, portanto, à viabilidade celular (Gerlier & Thomasset, 1986; Heo *et al.*, 1990).

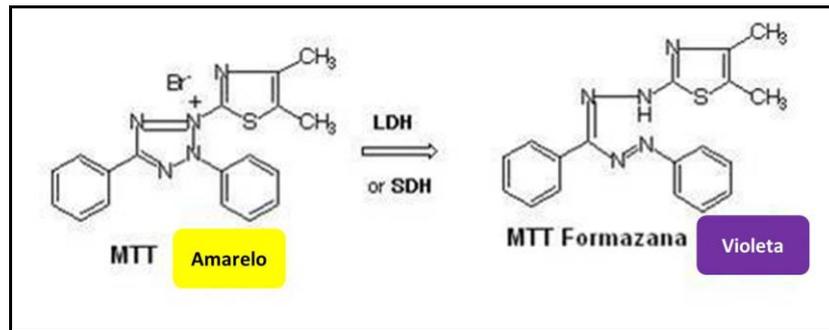


Figura 9. Reação da redução do composto MTT, de coloração amarela, a formazan (cristais de coloração roxa).

Outro método que pode ser usado para avaliar a viabilidade celular é o CellTiter Blue[®] (Promega) e também avalia a atividade metabólica das células. Este também é um ensaio colorimétrico, que se baseia na redução do composto resazurina. As células viáveis possuem a capacidade de reduzir a resazurina (composto com coloração azul) à resorufina (composto com coloração rosa), que é altamente fluorescente (Figura 10).

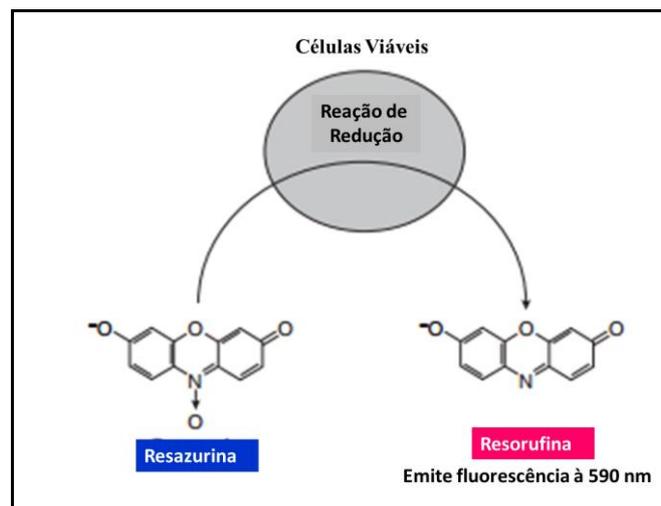


Figura 10. Conversão de resazurina para resorufina por meio de atividade metabólica das células, gerando um produto fluorescente. A fluorescência produzida é proporcional ao número de células viáveis.

Ensaio de morte celular

Para avaliar o processo de morte celular, pode-se usar um método de marcação de um fosfolípido de membrana, a fosfatidilserina (PS). Esse fosfolípido de membrana fica voltado para o citosol quando a célula está saudável. Assim que a apoptose se inicia, PS é translocada para a superfície exterior da bicamada lipídica, esse é um dos primeiros sinais que marcam a célula para ser fagocitada. No kit Anexina V-FICT de detecção de apoptose, temos a Anexina V é o marcador da PS e o iodeto de propídio (PI) marcador de DNA. Com Anexina-V

marcada com FICT (Isotiocianato de Fluoresceína) é possível avaliar os níveis de PS expostas na membrana celular externa, indicando a fase inicial do apoptose. Associando iodeto de propídio (PI) é possível mensurar células com permeabilidade de membrana, o que poderia indicar a fase tardia de apoptose ou necrose (Pec *et al.*, 2003).

2.2.6.2. *Compostos fenólicos e câncer*

O câncer é definido pela Sociedade Americana de Câncer (ACS – American Cancer Society) como “um grupo de doenças caracterizadas por um crescimento e disseminação descontrolados de células”. A falta de regulação de genes envolvidos no crescimento e divisão celular está diretamente relacionada ao desenvolvimento do câncer, onde fatores ambientais e genéticos estão envolvidos. Neste contexto, danos oxidativos ao DNA estão intimamente relacionados à carcinogênese. O estresse oxidativo induzido por ROS pode causar danos no DNA, que, quando não é reparado, pode levar à mutação da base, quebra de fitas simples e duplas e quebra e rearranjo cromossômico. Portanto, uma alimentação rica em compostos com propriedades antioxidantes, como os compostos fenólicos presentes em frutas, hortaliças e grãos integrais, pode potencialmente diminuir o risco de câncer e outros processos patológicos associados. As propriedades anti câncer dos compostos fenólicos vão além de seu papel antioxidante, também exercendo efeitos sobre a regulação da proliferação e diferenciação celular, a modulação de genes oncogênicos e supressores de tumor, e interferindo nas vias de morte e alterando a resposta celular a fatores de crescimento. Adicionalmente, já foi mostrado que alguns compostos fenólicos apresentam capacidade de prevenir metástase de tumores quando implantados em animais (Yilmaz & Toledo, 2004; Liu & Finley, 2005; Weng & Yen, 2012).

A atividade anticâncer dos compostos fenólicos tem sido amplamente estudada e alguns resultados importantes podem ser vistos na Tabela 3.

Tabela 3. Atividade anticâncer de compostos fenólicos.

Compostos Fenólicos	Tipo de câncer	Efeitos	Referências
Proantocianidinas	Linhagem de carcinoma mamário de camundongos	Inibição da metástase quando células implantadas no animal	Mantena <i>et al.</i> , 2006
Antocianina	Linhagem de carcinoma de cólon de rato	Indução da fragmentação do DNA	Yi <i>et al.</i> , 2005
	Células de tumor vascular humanas	Reparação e proteção da integridade do DNA genômico e retardo da angiogênese	Bagchi <i>et al.</i> , 2004
Procianidina, catequina ou ácido gálico	Células normais de baço de camundongos	Inibição dos danos ao DNA induzidos por peróxido de hidrogênio	Fan <i>et al.</i> , 2008
Catequina Procianidina	Linhagem de carcinoma mamário humano	Diminuição da viabilidade e da proliferação celular	Faria <i>et al.</i> , 2006
Flavona	Células de carcinoma de cólon humano	Redução da proliferação celular e indução da diferenciação e apoptose	
Flavonóides	Células de carcinoma de cólon humano	Indução de apoptose. Efeito mais potente quando comparado ao agente anti câncer camptotecina	Wenzel <i>et al.</i> , 2000
Resveratrol	Linhagem de carcinoma de próstata humana	Indução da apoptose e diminuição da proliferação celular	Kuwajerwala <i>et al.</i> , 2002
	Células de carcinoma mamário humano	Inibição da transcrição do gene da ciclo oxigenase-2 (efeito anti inflamatório)	Subbaramaiah <i>et al.</i> , 1998

Fonte: Xia *et al* (International Journal of Molecular Sciences, v. 11, p. 622-646, 2010).

Como mencionado anteriormente, a atividade biológica de extratos obtidos de alimentos ricos em polifenóis pode ser potencializada quando comparada à atividade dos compostos isolados, dado o potencial efeito sinérgico dos compostos. Portanto, a caracterização química dos extratos de alimentos, em relação à composição de fenólicos e à sua capacidade antioxidante, torna-se importante para a compreensão dos efeitos biológicos dos compostos bioativos em células humanas. Até o presente momento, tanto a caracterização dos extratos de resíduos da uva derivados da vitivinicultura brasileira, bem como a avaliação de sua bioatividade em células humanas ainda não foram realizados.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Investigar a bioatividade dos extratos bruto e concentrado por nanofiltração de resíduos da vitivinicultura em linhagem de hepatocarcinoma humano (HepG2) em cultura.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a citotoxicidade dos extratos bruto e concentrado por nanofiltração em células HepG2;
- Caracterizar os mecanismos de morte celular induzida pelo extrato concentrado por nanofiltração em células HepG2;
- Investigar a capacidade antioxidante celular do extrato concentrado em ensaio com células HepG2;
- Avaliar a citotoxicidade do extrato concentrado por nanofiltração em células de fibroblastos humanos (BEAS);
- Determinar os teores de compostos bioativos no extrato de resíduo concentrado por nanofiltração;
- Avaliar a capacidade antioxidante total do extrato de resíduo concentrado por nanofiltração.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATÉRIA PRIMA

O bagaço de uva foi proveniente da fabricação de vinho branco (Figura 11) da indústria vinícola da região da Serra Gaúcha (Bento Gonçalves/RS), obtido através de parceria com a EMBRAPA Uva e Vinho.



Figura 11. Bagaço de uva proveniente da fabricação de vinho branco.

4.2. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

A metodologia para obtenção dos extratos do bagaço de uva foi desenvolvida pela Dra. Ana Paula G. Cruz, onde o conjunto de resultados compôs sua tese de Doutorado obtida por este Programa de Pós-Graduação. Antes da extração, o bagaço foi reidratado por uma hora com água destilada na proporção de 2: 1 (bagaço: água), à 30 °C. A extração foi realizada com etanol 30% (v/v), pH 4,0 (ajustado com ácido cítrico), razão solvente: substrato 9: 1, e tempo de incubação de duas horas à 50 °C. O extrato bruto (EB) foi produzido na Planta Piloto de Processamento de Frutas da Embrapa Agroindústria de Alimentos, a saber: produção em tacho encamisado com agitação mecânica de 48 rpm, seguida de centrifugação em cestos, a $37,5 \times g$ e com malha de nylon como meio filtrante de 150 μ m para a separação das frações líquida e sólida. O EB foi concentrado através do processo de nanofiltração para obtenção do Extrato Concentrado (EC). A produção do EC foi realizada em sistema piloto e em membrana plana polimérica de poliamida com sistema tipo

espiral e com área filtrante total de 2,5m². A temperatura foi de 40 °C e o fluxo médio de 13,23 kg/h.m². O processo foi conduzido em regime de batelada simples. A concentração final de etanol nos EB e EC foi 30%. Os EB e EC (Figura 12) foram filtrados com o auxílio de bomba a vácuo através de uma membrana de celulose com 0,45 µm de poro Millipore®. Os EB e EC foram analisados quanto ao teor de compostos polifenólicos e quanto à capacidade antioxidante. Ensaio celulares foram realizados para avaliar a toxicidade e a capacidade antioxidante dos EB e EC, conforme descrito a seguir.



Figura 12. Extratos bruto (Alimentação) e concentrado (Retido). (Cruz, 2013).

4.3. ENSAIOS QUÍMICOS

4.3.1. Métodos de análise da capacidade antioxidante total e quantificação de compostos fenólicos nos extratos de resíduo da uva

No presente estudo, os EB e EC foram caracterizados quanto aos teores de fenólicos totais, flavonóides totais e antocianinas totais e monoméricas. Adicionalmente, a capacidade antioxidante total dos extratos (CAT) foi determinada através dos ensaios químicos TEAC (*Trolox equivalent antioxidant capacity*), ORAC (*Oxygen radical antioxidant capacity*) e TRAP (*Total radical-trapping antioxidant parameter*). Para as análises realizadas, o EB foi utilizado sem diluição prévia e o EC foi diluído 5 vezes.

4.3.2. TEAC

O método utilizado na presente dissertação foi adaptado de Re *et al.* (1999). O reagente ABTS foi diluído em água para preparo da solução estoque de 7 mM. Para a formação do radical ABTS^{•+}, foi preparada uma solução de ABTS 7 mM com 2,5 mM de K₂SO₅s. A solução foi guardada em frasco âmbar e armazenada em temperatura ambiente por 16 horas para formação e estabilização da solução de ABTS^{•+}. Esta solução concentrada de ABTS^{•+} foi diluída 50 vezes em água destilada, para obter uma absorvância de $0,700 \pm 0,020$ à 734 nm. Para construir a curva padrão de Trolox, foram elaboradas soluções nas concentrações de 100; 200; 400; 600; e 800 µM em etanol 30%, mantidas ao abrigo da luz. Estas soluções foram diluídas 25 vezes antes dos ensaios. Em uma placa de 96 poços foram adicionados 20 µL de etanol 30% (branco), 20 µL do reagente ABTS^{•+}, 20 µL dos padrões e 20 µL das amostras em triplicata. A placa foi colocada no leitor de microplaca (Victor X3, Perkin Elmer), onde 180 µL do reagente ABTS^{•+} foi injetado na placa. A leitura da absorvância foi feita em 734 nm, após 6 minutos de reação. Os resultados foram expressos em equivalentes de µmol de Trolox/g de extrato.

4.3.3. ORAC

A metodologia utilizada foi baseada no método descrito por Zulueta *et al.* (2009). Para o ensaio ORAC, foram feitas as seguintes soluções: tampão fosfato 75 mM, pH 7,4, fluoresceína de sódio 7,8 µM, em tampão fosfato (estoque), que foi diluída 1000 vezes em tampão fosfato (solução de trabalho); AAPH 221 mM. Todas as soluções foram protegidas da luz.

Para construir a curva padrão de Trolox, foram elaboradas soluções nas concentrações de 20; 30; 60; 100 e 120 µM em tampão fosfato 75 mM, que foram diluídas 100 vezes antes dos ensaios. Em uma placa de 96 poços foram adicionados 100 µL de amostra, padrão, ou tampão fosfato e 100 µL de fluoresceína. A placa foi levada ao leitor de microplacas e a reação foi iniciada pela adição de 50 µL de AAPH aos poços. A cinética da variação na absorvância foi avaliada em um intervalo de 60 segundos. Os parâmetros para a leitura da fluoresceína foram excitação a 485 nm e emissão a 535 nm. Os resultados foram expressos em equivalente de µmol de Trolox/g de extrato.

4.3.4. TRAP

O ensaio foi baseado no método descrito por Bartosz *et al.* (1998). Para o ensaio TRAP, foram feitas as seguintes soluções: tampão fosfato 75 mM, pH 7,4, ABTS 5 mM, e AAPH 400 mM, ambas em tampão fosfato 75 mM e protegidas da luz.

Para construir a curva padrão de Trolox, foram elaboradas soluções nas concentrações de 10; 20; 40; 60 e 90 μM em tampão fosfato 75 mM, também protegidas da luz, que foram diluídas 100 vezes antes dos ensaios. Em um tubo de ensaio, foram adicionados 2,010 mL de tampão fosfato 75 mM, 90 μL de ABTS 5 μM e 300 μL de amostra, padrão, ou tampão fosfato. Para iniciar a reação, 600 μL de AAPH foram adicionados aos tubos de ensaio. A determinação da cinética da variação na absorvância foi iniciada após 20 segundos em 428 nm, em um intervalo de tempo de 1200 segundos. Os resultados foram expressos em μmol de Trolox/g de extrato.

4.3.5. Fenólicos Totais

A quantificação dos fenólicos totais foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu (Georgé *et al.*, 2005). As seguintes soluções foram preparadas: carbonato de sódio 7,5% (g/v), Folin Ciocalteu 10% (v/v) e acetona 70% e 7% (v/v), em água. O Ácido Gálico foi utilizado como padrão nas concentrações 20, 40, 60, 80 e 100 mg/L, em acetona 7%.

Foram pesados cerca de 3 gramas de extrato em balão volumétrico de 25 mL, o volume foi completado com solução de acetona 70%, e submetido a agitação magnética por 30 minutos (balão protegido da luz). Após a agitação magnética, o extrato foi filtrado em papel de filtro quantitativo e 5 mL do filtrado foram transferidos para um balão volumétrico de 50 mL, que teve o volume completado com água destilada.

Em tubo de ensaio foi adicionado 500 μL do branco/padrão/amostra a ser analisada, seguido de 2,5 mL de solução de Folin-Ciocalteu a 10%, e os tubos de ensaio ficaram a temperatura ambiente por 2 minutos. Decorrido este tempo, 2 mL da solução de carbonato de sódio a 7,5% foi adicionado e os tubos foram agitados em vortex, sendo levados a banho-maria a 50°C por 15 minutos. Logo após, os tubos foram levados ao banho de gelo por 30 segundos e em seguida a absorvância foi lida no espectrofotômetro a 760 nm. Os resultados foram expressos em equivalentes de mg/L de ácido gálico/100g de extrato.

4.3.6. Flavonóides Totais

O método foi baseado na técnica descrita por Kao & Chen (2006). Para realizar a quantificação dos flavonóides totais foram preparadas as seguintes soluções: NaNO₂ 5% e NaOH 1M em água destilada e AlCl₃ 10% em etanol. Para construir a curva padrão de catequina, foram elaboradas soluções nas concentrações de 1; 5; 10; 25 e 50 mg/ L em etanol. As amostras foram diluídas 100 vezes.

Em tubo de ensaio foi pipetado 500 µL do branco/ padrão/ amostra a ser analisada, foram adicionados 75 µL de NaNO₂ 5% e os tubos permaneceram a temperatura ambiente por 5 minutos. Logo após, foram adicionados 150 µL de AlCl₃ 10%, foi homogeneizada e foi incubada por 5 minutos em repouso. Em seguida, foram adicionados 500 µL de NaOH 1M e foi feita a leitura em leitor de microplaca a 510 nm. Os resultados foram expressos em mg/ L de catequina/ 100g de extrato.

4.3.7. Antocianinas totais e monoméricas

O método usado para a quantificação das antocianinas totais e monoméricas foi o do pH diferencial, baseado na técnica descrita por Giusti & Wrolstad (2001). Para este método foi necessário preparar duas soluções tampão, uma com pH 1,0 e outra com pH 4,5. Para a solução tampão com pH 1,0 foram dissolvidos 3,725 g de cloreto de potássio em 250 mL de água destilada (solução A) e diluídos 13,10 mL de ácido clorídrico concentrado a 770 mL de água destilada (solução B). Então foi adicionada lentamente a solução B à solução A, medindo o pH a cada momento e ajustando o pH para 1,0 com a solução B. Para a solução tampão com pH 4,5 foram dissolvidos 54,40 g de acetato de sódio em 400 mL de água destilada (solução C) e diluídos 19,90 mL de ácido clorídrico concentrado a 240 mL de água destilada (solução D). A solução D foi adicionada lentamente à solução C, medindo o pH para 4,5 e ajustando o pH para 4,5 com a solução D.

Em dois balões volumétricos de 25 mL, 1,5 g das amostras foram pesados e completados com ambos os tampões. As amostras foram homogeneizadas por 10 segundos e logo depois, permaneceram em repouso por 25 minutos. Após este período, as amostras foram filtradas e após completar 30 minutos da adição do tampão, as amostras foram lidas a 510, 520 e 700 nm. Para a quantificação das antocianinas totais foram consideradas as absorvâncias de 510 e 700 nm com a solução de pH 1,0. Para a quantificação das antocianinas monoméricas foram consideradas as absorvâncias a 510 e 700 nm das amostras

diluídas nas soluções tampão pH 1,0 e 4,5. Os resultados foram expressos em mg cianidina 3-glicosídeo/ 100g de extrato.

4.4. ENSAIO CELULAR

Todos os ensaios celulares foram realizados no Laboratório de Proliferação e Diferenciação Celular (Instituto de Ciências Biomédicas, UFRJ).

4.4.1. Cultivo Celular

As células HepG2 foram descongeladas (10^6 células) e cultivadas em meio de cultura DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). As células foram mantidas em estufa com atmosfera controlada, contendo 5% de CO₂, e temperatura 37 °C.

A citotoxicidade do extrato de resíduos concentrado também foi avaliada em células normais de fibroblastos humanos (BEAS). Essas células foram cultivadas em meio de cultura RPMI, suplementado com 10% SFB. As células foram mantidas em estufa com atmosfera controlada, contendo 5% de CO₂, e temperatura 37 °C.

4.4.2. Avaliação da viabilidade celular

Para os ensaios de viabilidade celular pelo método do MTT, as células foram plaqueadas em placas de 12 poços ($\sim 10^5$ /poço) e após 48 horas, diferentes concentrações de etanol (veículo), EB ou EC foram adicionadas aos poços, conforme descrito na Tabela 4. A concentração do EB e do EC foi baseada no teor de sólidos totais. Dado que o etanol foi a solução extratora dos compostos bioativos do bagaço de uva (ver seção 4.2, Obtenção dos Extratos), a mesma concentração deste solvente foi utilizada nos ensaios controle para certificarmos os potenciais efeitos celulares dos compostos bioativos *per se*.

Tabela 4. Condições de tratamento das células HepG2 com etanol e extratos bruto e concentrado.

Amostra	Concentração
Etanol	1,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$
	3,0 $\mu\text{L}/\text{mL}$
	6,0 $\mu\text{L}/\text{mL}$
	7,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$
	15,0 $\mu\text{L}/\text{mL}$
	30,0 $\mu\text{L}/\text{mL}$
	45,0 $\mu\text{L}/\text{mL}$
Extrato Bruto	5,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$
	13,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$
	27,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$
	54,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$
	81,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Extrato Concentrado	84,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$
	169,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$
	338,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Para o teste de viabilidade celular pelo método de MTT, foram utilizadas as seguintes soluções de trabalho: MTT (0,05 mg/mL) em BSS (*Balanced Saline Solution*) e isopropanol ácido (0,01 N HCl).

As células foram incubadas com etanol/extrato por 1, 5 ou 24 horas, o meio de cultura foi retirado e as células foram incubadas com 1 mL por poço da solução de MTT, a 37 °C por

2h. Após este período, a solução de MTT foi removida e foi adicionado 1 mL de uma solução de isopropanol ácido para solubilizar os cristais de formazan. Após a solubilização dos cristais, esta solução foi centrifugada, o precipitado descartado e 100 µL do sobrenadante foram transferidos para uma placa de 96 poços. A absorbância foi lida a 570 nm e 650, para subtração do background, em um leitor de microplacas (VictorX3, Perkin Elmer).

Os ensaios com o reagente CTB foram realizados de acordo com as instruções do fabricante (Promega). O ensaio por CTB é mais sensível do que o método do MTT e, portanto, uma densidade celular menor é necessária para detecção da variação do estado de oxidação dos compostos.

Em placa de 96 poços foram plaqueadas 10^4 células por poço e após 48 horas as células foram incubadas com o etanol ou extrato nas concentrações apresentadas na Tabela 4, por 1, 5 ou 24 horas. Após o período de incubação, o meio contendo o extrato/etanol foi removido e foi adicionado DMEM + 20% do reagente por poço (80 µL DMEM + 20 µL reagente). As células foram incubadas à 37 °C, por 1 hora. Após o período de incubação, as células foram levadas ao leitor de microplacas para a leitura da fluorescência, com excitação a 550 nm e emissão a 570 nm. Nos dois métodos utilizados, as condições que diminuam a absorbância em mais de 10% quando comparada ao controle serão consideradas citotóxicas (Mosmann, 1983).

4.4.3. Microscopia

As células da linhagem HepG2 foram fotografadas, com aumento de 200 ×, após cada período de incubação, com microscópio invertido CKX41 (Olympus) e câmera digital Q-Color 5 (Olympus), para analisar o efeito do extrato sobre a morfologia das células.

4.4.4. Ensaio de apoptose

Para os ensaios de apoptose apenas o extrato concentrado foi testado. Em uma placa de 12 poços foram plaqueadas $8,5 \times 10^4$ células por poço em meio DMEM suplementado com 10% de SFB, a 37 °C e 5% de CO₂. Após 48 horas, as células HepG2 foram incubadas com o extrato concentrado/etanol nas mesmas concentrações usadas no teste de viabilidade (Tabela 4), por 5 horas a 37 °C e 5% de CO₂. Após o período de incubação, o meio contendo o extrato/etanol foi retirado, as células foram lavadas com PBS (*phosphate buffered saline*) e as células foram tripsinizadas. Após soltarem do fundo da placa, as células foram centrifugadas por 5 minutos, a 2000 rpm. O sobrenadante foi jogado fora e as células foram ressuspendidas

em 100 μL de solução tampão do kit Anexina V FITC. À placa, foram adicionados 5 μL de Anexina V por poço, envolta em papel alumínio e colocada a 4°C por 15 minutos. Em seguida, 10 μL de iodeto de propídio foram adicionados em cada poço e a placa ficou em repouso por mais 10 minutos. A suspensão contendo as células marcadas foi transferida para tubos específicos para leitura em citômetro de fluxo, onde foram adicionados 300 μL da solução tampão do kit. Foi realizada leitura de 20.000 células no citômetro de fluxo (FACScalibur). O programa utilizado para leitura foi Cell Quest e o programa utilizado para análise WinMDI 2.9.

4.4.5. Ensaio de capacidade antioxidante celular (CAC)

Para o ensaio de capacidade antioxidante celular, as seguintes soluções foram preparadas: DCFH-DA 50 μM em BSS, antimicina A 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em etanol. As concentrações de EC utilizados foram 84,5, 169 e 338 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Tabela 4) e de Ácido Gálico 100; 200; 400 e 500 μM em BSS.

Antimicina A foi utilizada para induzir a produção de ROS intramitocondrial, pois este composto atua como inibidor do complexo III da cadeia transportadora de elétrons e estimula a transferência de elétrons do complexo III e do complexo I para o oxigênio, promovendo a produção de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio. Portanto, a antimicina A foi utilizada para induzir a oxidação máxima da sonda DCFH.

O composto fenólico ácido gálico, com propriedades antioxidantes conhecidas, foi utilizado para avaliar o potencial celular máximo de prevenção da oxidação da sonda DCFH. Concentrações distintas de ácido gálico foram utilizadas para a construção da curva de calibração e para avaliar o potencial antioxidante das células HepG2. O potencial antioxidante do extrato dos resíduos da uva foi expresso em equivalentes de ácido gálico, conforme descrito por Wolfe e Liu (2007).

As células HepG2 (10^4 /poço) foram plaqueadas em placas de 96 poços e 48 horas após o subcultivo, foram incubadas com o extrato/etanol + 50 μM de DCFH-DA, e mantidas a 37 °C por 1 hora, protegidas da luz. Em seguida, as células foram lavadas com BSS e incubadas com antimicina A. A fluorescência foi lida logo em seguida, em modo cinético, por 2 horas a cada 5 minutos, com emissão a 538 nm e excitação a 485 nm.

4.4.6. Análises estatísticas

Os resultados da quantificação dos compostos bioativos e da capacidade antioxidante foram submetidos à análise estatística descritiva, média e erro padrão, análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey, usando o programa GraphPad Prism 6. Resultados com valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ENSAIOS QUÍMICOS

5.1.1. Capacidade antioxidante total

Na tabela 5, são apresentados os valores encontrados nos ensaios de capacidade antioxidante, TEAC, ORAC e TRAP.

Tabela 5. Valores do potencial antioxidante dos extratos.

Amostra	TEAC ($\mu\text{mol Trolox/ 100g}$ do extrato média \pm EP)	ORAC ($\mu\text{mol Trolox/ 100g}$ do extrato média \pm EP)	TRAP ($\mu\text{mol Trolox}100\text{g}$ do extrato média \pm EP)
Extrato Bruto	204,89 \pm 9,60	95,57 \pm 501,60	1644,00 \pm 49,20
Extrato Concentrado	1644,00 \pm 19,80*	560,80 \pm 404,40*	7332, 00 \pm 144,00*

TEAC: Ensaio de CAT (*Trolox equivalent antioxidant capacity*) onde o ABTS⁺ é sonda e radical iniciador; ORAC: Ensaio de CAT (*Oxygen radical antioxidant capacity*) onde o AAPH⁺ é o radical e a fluoresceína é sonda fluorescente; TRAP (*Total radical-trapping antioxidante parameter*) onde o ABTS⁺ é a sonda e o AAPH⁺ é o radical iniciador. (*, $p < 0,05$).

A atividade antioxidante dos extratos foi determinada pelos métodos ORAC, TEAC e TRAP. Como esperado, a atividade do extrato concentrado foi significativamente mais elevada quando comparada à atividade antioxidante do extrato bruto. Os resultados corroboram para o emprego de mais de uma metodologia para a determinação da capacidade antioxidante, devido aos diversos mecanismos de ação dos compostos bioativos. Testes de aplicação prática também vêm sendo muito apreciados para avaliar os extratos, os quais por apresentarem distintas classes de compostos bioativos podem apresentar sinergismos.

Pelegriani *et al.* (2003) avaliaram a capacidade antioxidante de diversas frutas, bebidas e vegetais. Dentre as frutas, foram analisadas uvas brancas e tintas, chegando ao resultado de TEAC e TRAP, respectivamente, 2,48 e 1,59 $\mu\text{mol Trolox/ kg}$ da fruta, para uvas brancas, e 3,85 e 2,50 $\mu\text{mol Trolox/ kg}$ da fruta, para uvas tintas. Dado que os autores realizaram quatro extrações totais (duas com água e duas com acetona como soluções extratoras), os resultados da presente dissertação indicam que a extração dos compostos bioativos foi eficiente visto a

alta capacidade antioxidante dos extratos bruto e concentrado. Assim como descrito na seção material e métodos, somente uma extração foi realizada utilizando apenas uma solução extratora, etanol: água (30: 70). A escolha da solução extratora deste trabalho se deve ao fato do etanol ser um solvente não tóxico e de fácil recuperação.

Com o objetivo de analisar a capacidade antioxidante de vinhos branco e tinto, Serafini *et al.* (1998) usaram o método TRAP e obtiveram os seguintes resultados: 1,9 e 40,0 $\mu\text{mol Trolox/ mL}$, para branco e tinto, respectivamente. Ao comparar os valores encontrados com os extratos concentrados para os dois tipos de vinhos, observamos que foram menores do que os valores obtidos no presente trabalho, indicando, mais uma vez, a alta eficiência de extração e a preservação de compostos bioativos com atividade antioxidante nos resíduos da vitivinicultura.

Ao comparar a capacidade antioxidante dos extratos bruto e concentrado descrita no presente trabalho com os resultados obtidos por Seeram *et al.* (2008) para o vinho tinto observamos um menor potencial antioxidante do extrato bruto, sendo os valores de ORAC e TEAC , 24,0 e 17,1 $\mu\text{mol Trolox/ mL}$, respectivamente. Pode-se especular que esta diferença seja decorrente do processo de vinificação tinto, na qual o bagaço permanece no mosto durante a fermentação alcoólica por até 7 dias, o que pode favorecer a extração dos compostos bioativos pelo etanol produzido neste processo. Por outro lado, o bagaço utilizado no presente trabalho é proveniente de uva tinto vinificada em branco, onde, logo após a prensagem das uvas o bagaço é removido, diminuindo a possibilidade de extração preservando o elevado teor destes compostos bioativos

No estudo realizado por Chamorro *et al.* (2012), que avaliaram extrato de bagaço de uva quanto à atividade antioxidante por TEAC, foi observado um valor maior ao encontrado no presente trabalho, 0,184 mmol Trolox/ g de matéria seca. Essa diferença se deve, possivelmente, ao método de preparação da amostra para análise onde o bagaço de uva foi seco e pulverizado, e o pó foi usado nas análises, sendo possível medir o máximo da capacidade antioxidante do bagaço.

Cataneo *et al.* (2008) estudaram o potencial antioxidante do resíduo agroindustrial da produção de vinho pelo teste de TEAC e obtiveram o resultado de 98,92 $\mu\text{mol Trolox/ g}$ da amostra. Apesar de a capacidade antioxidante ser mais elevada quando comparada à encontrada no presente trabalho, alguns aspectos metodológicos necessitam ser considerados. As amostras foram submetidas a dois tratamentos térmicos (80 °C/ 10 minutos para inativação de enzimas e 45 °C/ 4 horas para secagem da amostra). Em um estudo anterior já foi

demonstrado que o tratamento térmico aumenta a solubilidade dos compostos fenólicos (Lee *et al.*, 2003), rendendo um extrato com maior potencial antioxidante.

Stockham *et al.* (2013) analisaram marcas diferentes de vinhos tintos quanto à capacidade antioxidante usando o método ORAC e encontraram um valor médio de 5,5 μmol Trolox/ mL da amostra, sendo este valor superior somente ao encontrado no presente trabalho para o extrato bruto. Este dado indica, mais uma vez, a eficiência de extração dos compostos bioativos dos resíduos de uva e mostra a importância da concentração da amostra para aumentar seu potencial antioxidante.

Todos esses dados indicam que os métodos utilizados nesta dissertação para avaliar a capacidade antioxidante dos extratos de resíduos da vitivinicultura brasileira são apropriados. Esses dados também mostram que tanto o teor de compostos bioativos como a eficiência de extração destes compostos dependerá dos métodos de obtenção dos resíduos e de preparação dos extratos. Em função dos resultados obtidos na presente dissertação pode-se afirmar que os resíduos utilizados apresentaram um alto teor de compostos bioativos, dada a elevada capacidade antioxidante recuperada dos extratos, comparada tanto com resultados prévios de extratos de resíduos como de extratos de uva e vinho tintos.

5.1.2. Quantificação dos compostos fenólicos

Na tabela 6, são apresentados os valores de fenólicos totais (FeT), flavonóides totais (FlaT) e antocianinas totais (AT) e antocianinas monoméricas (AM).

Tabela 6. Valores da quantificação dos compostos bioativos presentes nos extratos.

Amostra	Fenólicos Totais (mg EAG/ 100g do extrato média \pm EP)	Flavonóides Totais (mg EC/ 100g do extrato média \pm EP)	Antocianinas Totais (mg cianidina 3- glicosídeo/ 100g do extrato média \pm EP)	Antocianinas Monoméricas (mg cianidina 3- glicosídeo/ 100g do extrato média \pm EP)
Extrato Bruto	889,0 \pm 8,2	580,0 \pm 31,4	187,0 \pm 11,0	160,0 \pm 11,8
Extrato Concentrado	4738,0 \pm 524,0*	1475,0 \pm 27,7*	1055,0 \pm 72,7*	914,0 \pm 74,5*

*, $p < 0,05$

Os resultados obtidos mostram que os extratos de bagaço de uva apresentam teores elevados dos compostos bioativos analisados e que a concentração do extrato pelo processo de nanofiltração resultou em um aumento significativo destes teores.

Negro *et al.* (2003) avaliaram FeT em resíduos da vitivinicultura extraídos com etanol acidificado e encontraram teores 50% inferiores aos encontrados no presente trabalho, indicando que a extração alcoólica utilizada mostrou-se eficiente na recuperação destes compostos bioativos. O trabalho de Li Fu *et al.* (2011) teve como objetivo avaliar e quantificar os componentes fenólicos de diferentes tipos de frutas, dentre elas a uva. Os resultados do presente trabalho foram maiores, levando em consideração que os extratos utilizados no trabalho citado foram da fruta sem a casca e os extratos deste trabalho foram de bagaço de uva, composto principalmente pelas cascas e sementes. Cliff *et al.* (2007) estudou vinhos de diferentes marcas para caracterizar o perfil de compostos bioativos da bebida. Os resultados para fenólicos totais foram 93,2; 102,5; 105,5 e 106,3 mg equivalente de ácido gálico/ 100 mL da amostra. Os resultados de antocianinas totais foram 0,242; 0,350; 0,401 e 0,476 mg malvidin-3-glucoside/ 100 mL de vinho, antocianinas monoméricas foram 0,072; 0,109; 0,126 e 0,168 mg malvidin-3-glucoside/ 100 mL de vinho. Os resultados de fenólicos totais, antocianinas totais e monoméricas foram inferiores ao deste trabalho, isso pode ser explicado pelo método utilizado que foi com uma solução de dióxido de enxofre e acetaldeído.

O trabalho de Abe *et al.* (2007) focou a identificação e a quantificação de compostos bioativos da uva. Para isto os autores determinaram o teor de fenólicos totais, antocianinas totais e flavonóides totais. Os resultados variaram de acordo com o cultivar da fruta. Os resultados para fenólicos totais foram na faixa de 65- 391 mg equivalente de ácido gálico/ 100g da fruta; os de antocianinas totais foram 18- 248 mg cianidina-3-glicosídeo/ 100 g da fruta e os de flavonóides totais foram 4,5- 182,0 mg de agliconas/ 100g da fruta. Os resultados encontrados neste trabalho estão de acordo com os de Abe *et al.*, mesmo não sabendo quais cultivares presentes no bagaço utilizado neste trabalho.

No trabalho de Cataneo *et al.* (2008) o objetivo foi quantificar os compostos fenólicos de diferentes extratos de resíduos agroindustriais da produção de vinho. Diferentes condições de tratamentos térmicos foram aplicadas aos extratos e a condição que melhor extraiu os compostos fenólicos foi a de 45 °C por quatro horas, alcançando o valor de 207 mg equivalentes de ácido gálico/ 100g da amostra seca. O fator de usar tratamento térmico na preparação da amostra pode ter facilitado a conversão de compostos fenólicos insolúveis em

solúveis, porém quando comparado ao extrato concentrado este teve a quantidade de compostos fenólicos vinte vezes maior.

Com o objetivo de analisar apenas os compostos presentes nas cascas de uvas, Luque-Rodriguez *et al.* (2007) avaliaram cascas provenientes de bagaço de uva da fabricação de vinho. Fizeram análises de fenólicos totais, antocianinas totais e de flavonóis, que é uma classe dos flavonóides. As cascas foram secas a 40 °C por 24 horas antes da quantificação, e como resultados os autores encontraram de fenólicos 126 mg equivalentes de ácido gálico/ g de casca seca para fenólicos totais, 17 mg equivalentes de cianidina-3-glicosídeo/ g de casca seca para antocianinas totais e 35 mg equivalentes de catequina/ g de casca seca para flavonóis. Os teores encontrados foram inferiores ao deste trabalho, apesar de ter um tratamento térmico antes de fazer a quantificação dos compostos, assim como no trabalho de Cataneo *et al.* (2008), mas no presente trabalho a extração foi feita de todo o bagaço, casca, semente e engaço.

Sun *et al.* (2002) determinaram o teor e o perfil de compostos fenólicos de diversas frutas, dentre elas a uva tinta. O valor encontrado de fenólicos totais na uva tinta de 182 mg equivalentes de ácido gálico/ 100 g de uva, sendo este valor menor que o encontrado neste trabalho para os extratos bruto e concentrado. A forma de extração dos compostos fenólicos da uva foi diferente da usada para extrair os compostos fenólicos do bagaço, a solução utilizado no trabalho citado foi acetona 80 %, que foi evaporada e o extrato foi reconstituído com água, concentrando desta forma o extrato da uva, o que justifica o maior teor de compostos fenólicos no extrato da uva, mas seu valor foi inferior ao extrato concentrado neste trabalho. Mostrando que o método para concentração do extrato, por nanofiltração, foi eficaz na conservação dos compostos bioativos presentes no mesmo.

Com os resultados obtidos em relação à quantificação dos compostos bioativos e do potencial antioxidante dos extratos, podemos afirmar que este método de extração dos compostos fenólicos é eficaz, conservando suas propriedades e que o método de concentração do extrato também se mostrou eficaz ao concentrar e manter a característica dos compostos bioativos quanto ao potencial antioxidante.

5.2. ENSAIO CELULAR

5.2.1. Extrato bruto

5.2.1.1. Viabilidade Celular

Com a finalidade de verificar qual seria a melhor condição de trabalho com as células HepG2 e com os extratos, foram feitos testes de viabilidade celular.

O primeiro teste feito foi com o tempo de incubação de 24 horas com o extrato bruto. A Figura 13 mostra o gráfico com os resultados da viabilidade celular e os resultados da análise estatística. Não foi possível analisar as células incubadas com a maior concentração de etanol (45 $\mu\text{L}/\text{mL}$), visto que as células estavam soltas do fundo da placa.

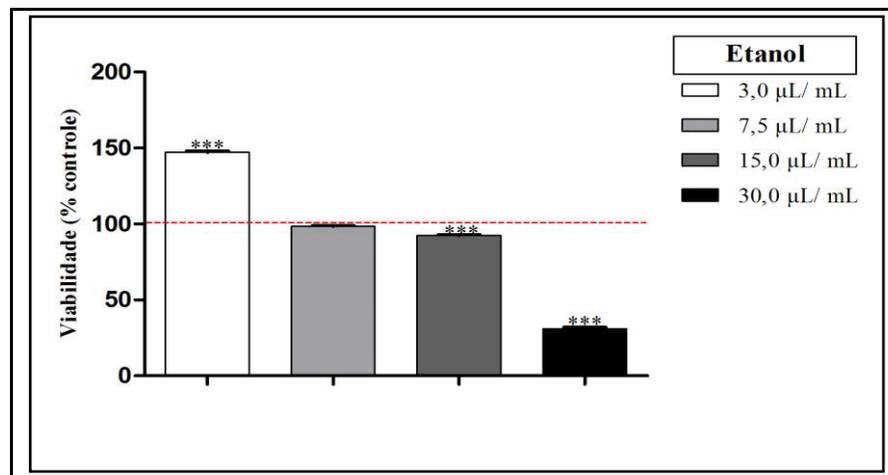


Figura 13. Efeito do etanol sobre a viabilidade celular das células da linhagem HepG2 (24 h). As células HepG2 foram incubadas por 24 horas com o etanol, nas concentrações indicadas e a viabilidade foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT, como descrito na Seção 4.4.2. Os resultados são expressos como média e erro padrão ($n=3$). ***, $p < 0,001$ (ANOVA com pós-teste de Tukey), comparado às células controle sem etanol.

Pode-se observar na Figura 13, que o tratamento das células HepG2 com etanol na concentração 3,0 $\mu\text{L}/\text{mL}$ alterou de forma positiva a viabilidade celular, aumentando em 47%. Não houve alteração significativa da viabilidade na concentração de 7,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ no tempo de 24 horas. O tratamento das células com o etanol na concentração de 15 $\mu\text{L}/\text{mL}$ promoveu uma redução significativa da viabilidade celular, mas não foi considerado citotóxico, pois diminuiu em 8% a viabilidade celular. O tratamento com etanol na concentração de 30 $\mu\text{L}/\text{mL}$ promoveu uma redução significativa da viabilidade em 70%, sendo considerado citotóxico. Cameron *et al.* (1998), ao investigar a citotoxicidade do etanol em HepG2, viu a viabilidade celular diminuir 68% ao expor as células a uma concentração de etanol de 80 mM, num período de incubação de 24 horas. Ao incubar essas células por mais

24 h com etanol, a viabilidade diminuiu em 79%. Mostrando que o uso de etanol causa danos em células HepG2, proporcional a concentração em que é utilizado (Neuman *et al.*, 1993). Por outro lado, em concentrações mais baixas, apresenta uma resposta proliferativa.

A Figura 14 apresenta o gráfico com os resultados do teste de viabilidade celular após a incubação com o extrato bruto por 24 horas. As células incubadas com a maior concentração de extrato bruto, 81 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de sólidos totais, não foram analisadas, pois 100% das células não estavam viáveis. O controle para as células incubadas com extrato foi o etanol.

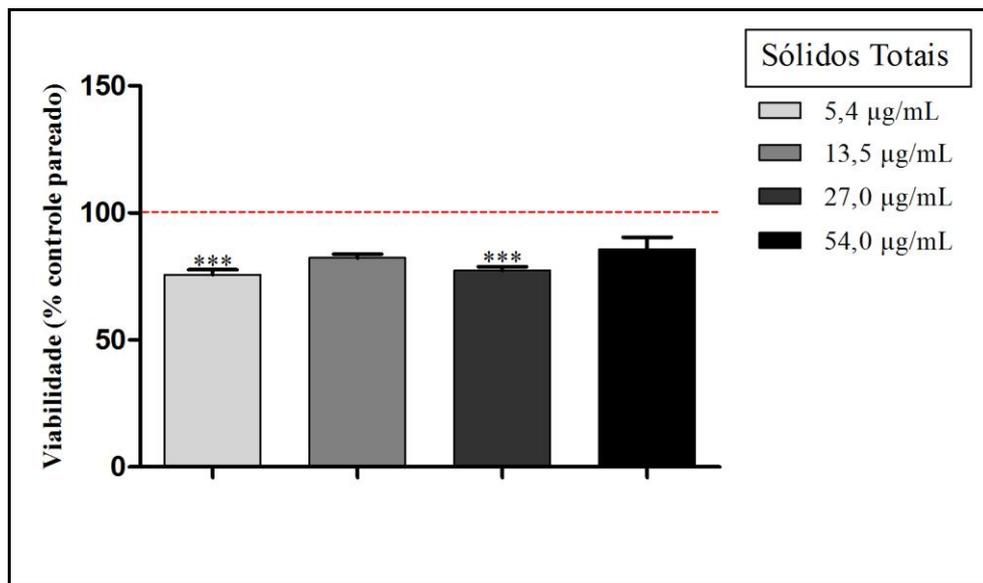


Figura 14. Efeito do extrato hidroetanólico de resíduo da vitivinicultura bruto sobre a viabilidade celular da linhagem HepG2 (24 h). As células foram incubadas por 24 horas com o extrato bruto, nas concentrações indicadas e a viabilidade foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT, como descrito na Seção 4.4.2. Os resultados são expressos como média e erro padrão ($n=3$). ***, $p < 0,001$ (ANOVA com pós-teste de Tukey), comparado às células controle com etanol.

No gráfico do efeito do extrato bruto na viabilidade celular (Figura 14), pode-se observar que todas as concentrações do extrato bruto alteraram a viabilidade de maneira significativa no tempo de 24 horas. Todas as condições do extrato testadas diminuiriam mais de 10% a viabilidade celular de HepG2, sendo consideradas citotóxicas para as células. Com esses resultados, concluímos que nenhuma das condições testadas foi considerada adequada para trabalhar com as células, pois foram consideradas citotóxicas para as células de HepG2.

5.2.1.2. *Microscopia*

Após cada período de incubação, foram tiradas fotos das células com um microscópio invertido com contraste de fase. A Figura 15 mostra as fotos das células incubadas com o etanol e extrato bruto, por 24 horas.

Podemos observar que o extrato bruto modificou a morfologia de HepG2, mesmo na menor concentração (5,4 µg de sólidos totais/mL de meio) e que o etanol, na concentração mais baixa, não teve efeito sobre as células. Porém ao aumentar o volume de etanol no meio, este começou a afetar as células da mesma forma que o extrato, tornando a leitura dos resultados confusa, pois não é possível distinguir os efeitos do etanol e do extrato nas células.

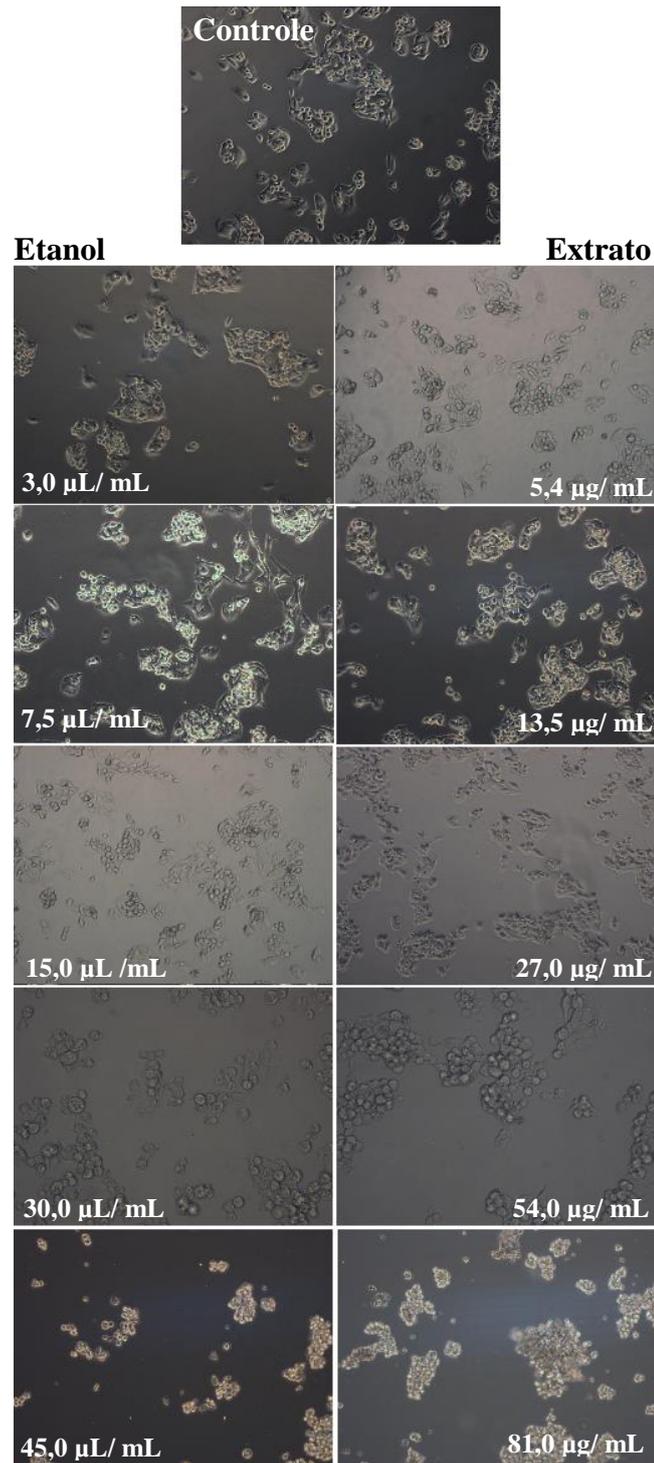


Figura 15. Microscopia de contraste de fase das células HepG2 incubadas com etanol (controle pareado) e extrato hidroetanólico de resíduo da vitivinicultura por 24 horas. As concentrações do extrato bruto (μg de sólidos totais/ mL de meio de cultura) estão indicadas na área das fotografias. As concentrações de etanol ($\mu\text{L}/\text{mL}$ de meio de cultura; apresentadas na área das fotografias) foram pareadas àquelas usadas nas células com o extrato bruto (controle pareado). Todas as fotografias foram registradas com aumento de 100 \times .

Com o aumento da concentração e, conseqüentemente, o aumento do efeito do etanol e do extrato nas células, observamos que além de modificar a morfologia de HepG2, as células começaram a soltar do fundo do poço da placa. Este fato pode indicar morte celular, pois a HepG2 é uma célula aderente, ou seja, a aderência da célula ao fundo da placa é fundamental para sua sobrevivência.

5.2.2. Extrato Concentrado

5.2.2.1. Viabilidade Celular

A Figura 16 apresenta o gráfico com os resultados do teste de viabilidade celular de HepG2 após o tratamento com o etanol por 1 hora.

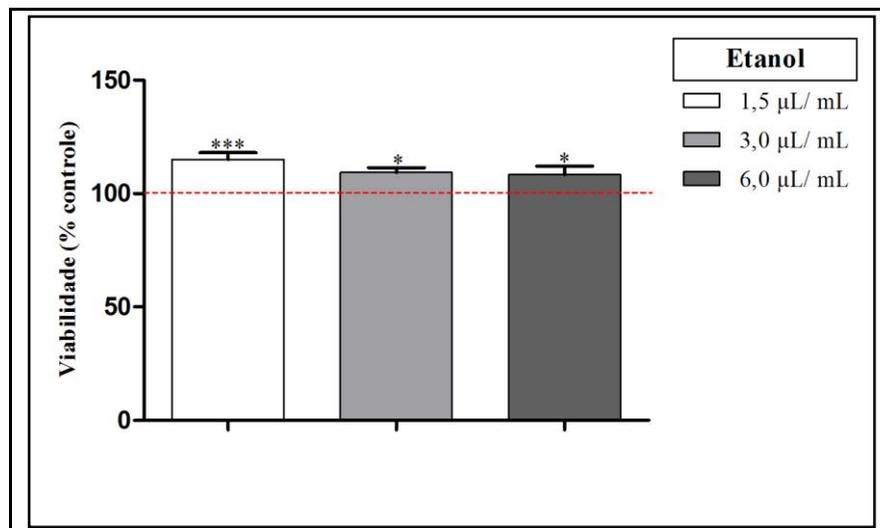


Figura 16. Efeito do etanol sobre a viabilidade celular da linhagem HepG2 (1 h). As células foram incubadas por 1 hora com etanol, nas concentrações indicadas e a viabilidade foi avaliada pelo método de redução do CTB, como descrito na Seção 4.4.2. Os resultados são expressos como média e erro padrão ($n=3$). *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$ (ANOVA com pós-teste de Tukey), comparado às células controle sem etanol.

Ao observar o gráfico da Figura 16, concluímos que nenhuma concentração do etanol alterou a viabilidade celular de HepG2. Portanto, fizemos uma média das concentrações de etanol para utilizar como controle das células incubadas com extrato concentrado.

A Figura 17 mostra o gráfico com os resultados do ensaio de viabilidade celular após o tratamento com o extrato concentrado com o período de incubação de 1 hora.

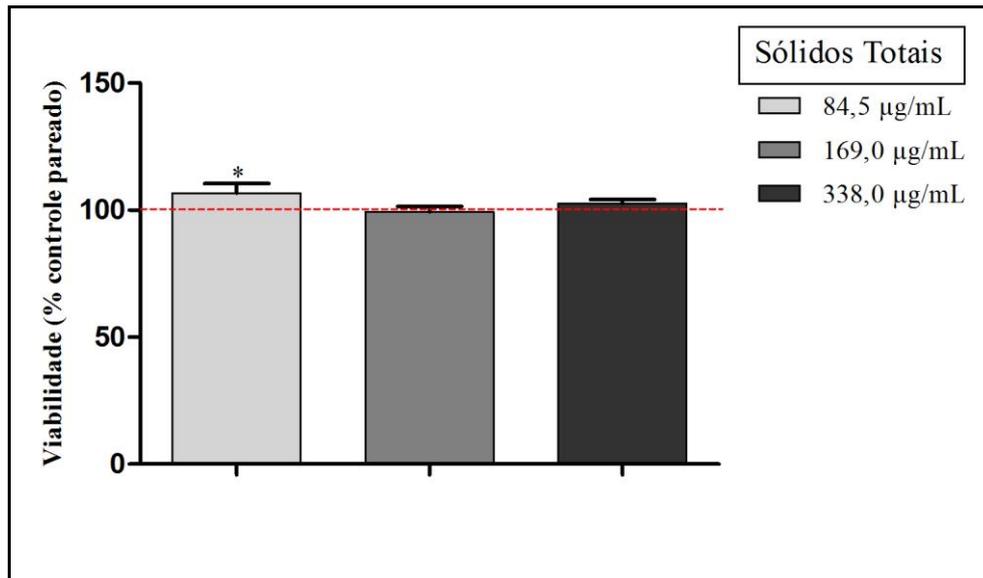


Figura 17. Efeito do extrato de resíduo da vitivinicultura concentrado por nanofiltração sobre a viabilidade celular da linhagem HepG2 (1 h). As células foram incubadas por 1 hora com o extrato concentrado, nas concentrações indicadas e a viabilidade foi avaliada pelo método de redução do CTB, como descrito na Seção 4.4.2. Os resultados foram expressos como média e erro padrão ($n=3$). *, $p < 0,05$ (ANOVA com pós-teste de Tukey), comparado às células controle.

Como podemos ver no gráfico de viabilidade celular (Figura 17), nenhuma das condições testadas com o extrato concentrado foi considerada citotóxica para as células, pois não afetou de forma negativa o metabolismo das células HepG2. Crespo *et al.* (2008) testaram a viabilidade celular da linhagem CHL, uma linhagem de células derivadas de hepatócitos humanos, com o composto quercetina nas concentrações 5, 25 e 50 μM por 2 horas de incubação. A condição 50 μM diminuiu a viabilidade de CHL em 11%, sendo a única considerada citotóxica para a célula, as outras condições não interferiram na viabilidade celular de CHL, assim como as concentrações do extrato concentrado testadas com o tempo de 1 hora de incubação. Kim *et al.* (2013) analisaram a citotoxicidade de três diferentes frações de extratos de sementes de uva em células da linhagem HepG2. As frações: CFE (extrato rico em polifenóis), OPF (fração contendo procianidina oligomérica) e PPF (fração contendo procianidina polimérica), com tempo de incubação de 6 horas. Eles constataram que nenhuma das frações interferiu na viabilidade celular de HepG2, os resultados corroboram com o encontrado no presente trabalho. O resultado do ensaio de viabilidade celular para 1 hora de incubação nos mostra uma possível condição de trabalho com células e extrato concentrado.

A Figura 18 mostra o gráfico com os resultados do teste de viabilidade celular após o tratamento com o extrato concentrado por 5 horas.

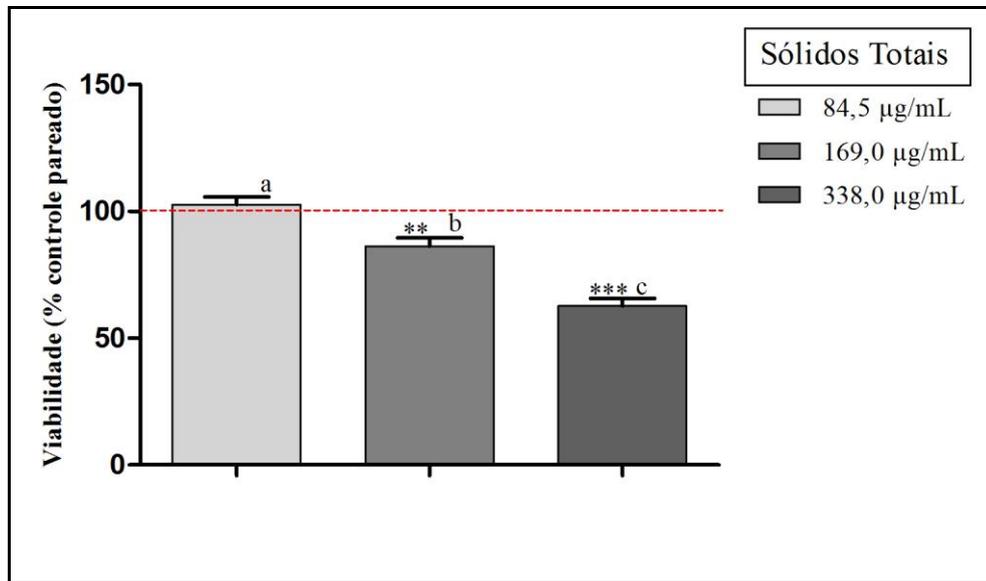


Figura 18. Efeito do extrato de resíduo da vitivinicultura concentrado por nanofiltração sobre a viabilidade celular da linhagem HepG2 (5 h). As células foram incubadas com o extrato concentrado por 5 horas, nas concentrações indicadas e a viabilidade foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT, como descrito na Seção 4.4.2. Os resultados foram expressos como média e erro padrão ($n=3$). Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças significativas com a concentração imediatamente inferior de sólidos totais. **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ (ANOVA com pós-teste de Tukey) comparado ao seu controle pareado quanto à concentração de etanol.

Assim como o tempo de 1 hora de incubação, as diferentes concentrações estudadas de etanol não diminuiram a viabilidade celular, não tendo diferença significativa entre as concentrações de etanol.

Ao observar a Figura 18, vemos que o tratamento das células HepG2 com o extrato concentrado na concentração de 84,5 µg/ mL não alterou a viabilidade celular de maneira significativa. Entretanto, a exposição das células ao extrato concentrado nas concentrações de 169,0 e 338,0 µg/ mL promoveu uma redução significativa da viabilidade de 16 e 24%, respectivamente. Foi observado que ao aumentar a concentração do extrato concentrado, a viabilidade de HepG2 diminui, podendo concluir que o efeito do extrato é dose dependente. Ramos *et al.* (2008) analisaram a citotoxicidade do composto quercetina em células da linhagem HepG2 e constataram que após um período de 72 horas de incubação, o composto na concentração 100 µM diminuiu a viabilidade de HepG2 em 28,1%, valor aproximado ao encontrado para a maior concentração de extrato testada (338,0 µg/ mL). Fernández-Peréz *et*

al. (2012) usaram resveratrol proveniente de uvas tintas para avaliar a viabilidade de outro modelo de linhagem celular, a linhagem Jukart, que são células derivadas da leucemia aguda de células T. Este composto, na concentração de 100 μM , diminuiu a viabilidade celular em até 75%, num período de 24 horas de incubação. Os resultados de Ramos *et al.* (2008) e Fernández-Peréz *et al.* (2012) mostram que os resultados do presente trabalho estão de acordo com a literatura. Podemos concluir que compostos fenólicos alteram negativamente a viabilidade celular, dependendo da sua concentração e o tempo de exposição.

A Figura 19 apresenta o gráfico com os resultados do teste de viabilidade celular após o tratamento com o etanol por 24 horas.

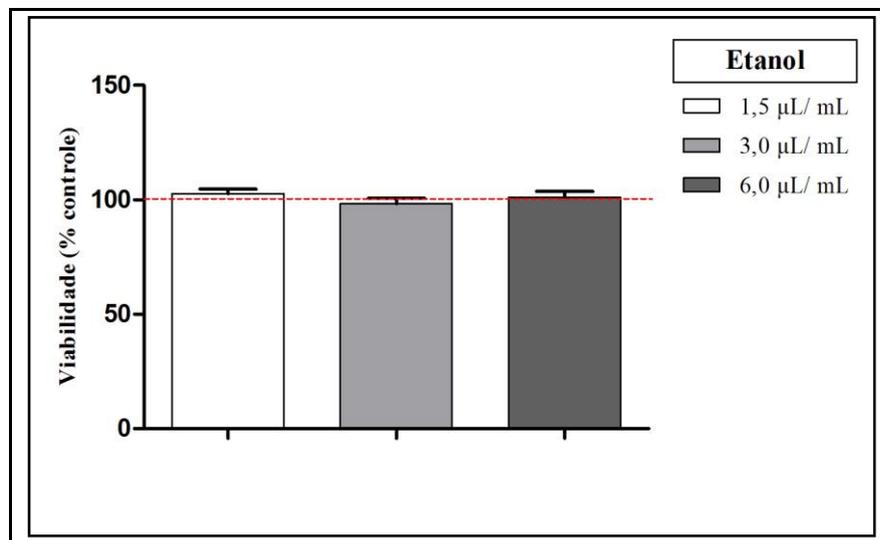


Figura 19. Efeito do etanol (24 h) sobre a viabilidade celular da linhagem HepG2. As células foram incubadas por 24 horas com o etanol, nas concentrações indicadas e a viabilidade foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT, como descrito na Seção 4.4.2. Os resultados foram expressos como média e erro padrão ($n=3$). Não houve diferenças significativas (ANOVA com pós-teste de Tukey).

Na Figura 19, pode-se observar que o tratamento das células de HepG2 com etanol não alterou a viabilidade celular, mesmo com 24 horas de incubação. Este resultado, assim como os resultados dos outros tempos de incubação (1 h e 5 h), nos certifica que qualquer modificação com as células foi devido aos compostos presentes no extrato concentrado.

A Figura 20 mostra o gráfico com os resultados do teste de viabilidade celular após o tratamento com o extrato concentrado por 24 horas.

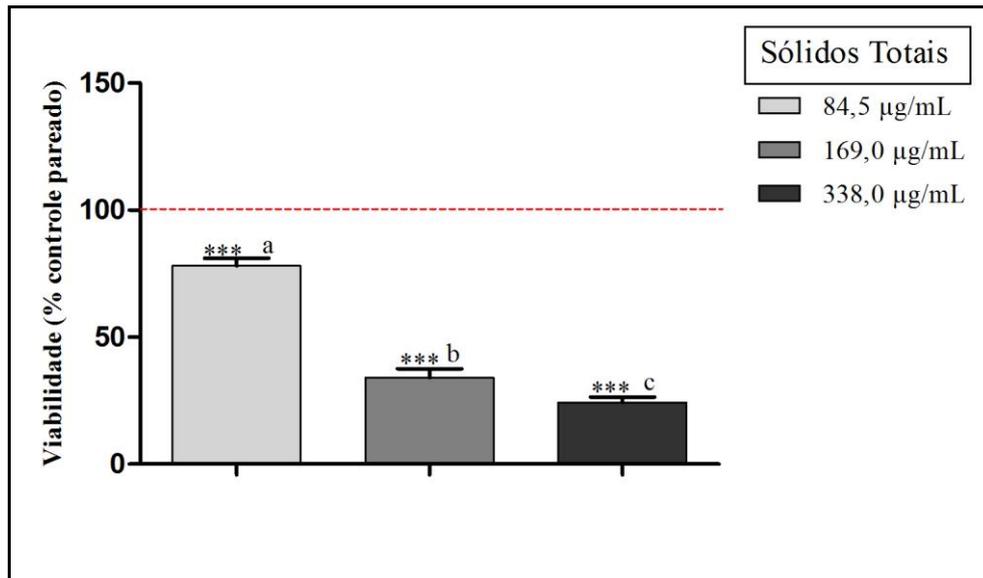


Figura 20. Efeito do extrato de resíduo da vitivinicultura concentrado por nanofiltração sobre a viabilidade celular da linhagem HepG2 (24 h). As células foram incubadas por 24 horas com o extrato concentrado, nas concentrações indicadas e a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT, como descrito na Seção 4.4.2. Os resultados foram expressos como média e erro padrão ($n=3$). Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças significativas com a concentração imediatamente inferior de sólidos totais. ***, $p < 0,001$ (ANOVA com pós-teste de Tukey) comparado ao seu controle pareado quanto à concentração de etanol.

Podemos observar que o tratamento das células HepG2 com o extrato concentrado nas concentrações de 84,5; 169,0 e 338,0 µg/mL promoveu uma redução significativa da viabilidade de 25, 64 e 75%, respectivamente. Assim como no período de 5 horas, podemos observar que ao aumentar a concentração do extrato, diminuimos a viabilidade celular de HepG2. O resultado da análise estatística indica diferença significativa entre as diferentes concentrações de extrato, mostrando que o efeito na viabilidade celular diminuiu de acordo com o aumento da concentração de sólidos totais.

Valdameri (2012) testou o composto flavona para avaliar seu efeito sobre a viabilidade das células HepG2, com tempos de incubação de 24, 48, 96 e 144 horas. Com o tempo de incubação de 96 horas com 100 µM de flavona, a viabilidade celular de HepG2 diminuiu 62,2% e com 144 horas de incubação do mesmo composto na mesma concentração, a viabilidade celular diminuiu 70,8%. Esses valores da viabilidade foram os que mais se aproximaram dos resultados encontrados no presente trabalho, porém com um tempo menor de incubação. Scoparo (2012) analisou o composto hispidulina, que é um tipo de flavona. Com o tempo de incubação de 24 horas, o composto nas concentrações de 50, 100 e 200 µM

diminuiu a viabilidade de HepG2 em 24, 45 e 53%, respectivamente. Valores próximos aos encontrados no presente trabalho, porém somente após o período de 48h, com uma concentração de 200 μM , a hispidulina diminuiu em 68% a viabilidade celular, resultado que foi alcançado com 24 horas de incubação quando foi utilizado o extrato concentrado. Os resultados encontrados por Valdameri (2012) e Scoparo (2012), citados acima, precisaram de mais tempo de incubação com o composto estudado para a diminuição da viabilidade celular de HepG2, isto pode ser explicado pelo uso apenas de um composto isolado para testar a viabilidade celular, necessitando de um tempo maior para diminuir o número de células viáveis, já no nosso trabalho a viabilidade de HepG2 foi testada por um extrato que contém um conjunto de compostos bioativos, não apenas um composto isolado. García-Alonso *et al.* (2006) com o objetivo de modular o efeito de frações de sucos de uva ricas em compostos fenólicos, testou a viabilidade destes sucos em células da linhagem HepG2. As células ficaram incubadas por três horas com sucos contendo diferentes teores de fenólicos totais (2, 10, 20 e 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$), então as células foram lavadas e foi adicionado ao poço meio de cultura contendo peróxido de hidrogênio, as células ficaram 24 horas incubadas e o teste de MTT foi realizado. O suco de uva com a concentração de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de fenólicos totais e 25 μM de H_2O_2 , diminuiu a viabilidade de HepG2 em 25%, sendo este um valor semelhante ao encontrado no nosso trabalho para a concentração de 84,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do extrato concentrado mostrando, portanto, que os resultados encontrados no presente trabalho corroboram com encontrado na literatura.

Após a análise dos resultados dos ensaios de viabilidade celular para os períodos de incubação de 1, 5 e 24 horas com o extrato concentrado, foi possível escolher a melhor condição para se realizar o ensaio de capacidade antioxidante celular (CAC), utilizando as seguintes concentrações para o extrato concentrado: 84,5; 169,0 e 338,0 μg de sólidos totais/ mL , incubadas por 1 hora.

5.2.2.2. *Microscopia*

Após cada período de incubação das células com o extrato concentrado, foram feitas fotos das células com um microscópio invertido com contraste de fase. Na figura 21, podemos ver as fotos das células após a incubação com o extrato concentrado, por 1 hora.

Como podemos observar na Figura 21, as células incubadas com etanol não tiveram mudanças em sua morfologia. As células que foram tratadas com o extrato concentrado nas concentrações 84,5 e 169,0 $\mu\text{g/ mL}$ de sólidos totais permaneceram com sua morfologia preservada, já na concentração mais alta (338,0 $\mu\text{g/ mL}$ de sólidos totais) foi observada mudança na morfologia, as células ficaram com a forma arredondada, indicando uma menor aderência à superfície dos frascos. Portanto, apesar desta condição não afetar a viabilidade das células, observamos um efeito importante na morfologia das células HepG2.

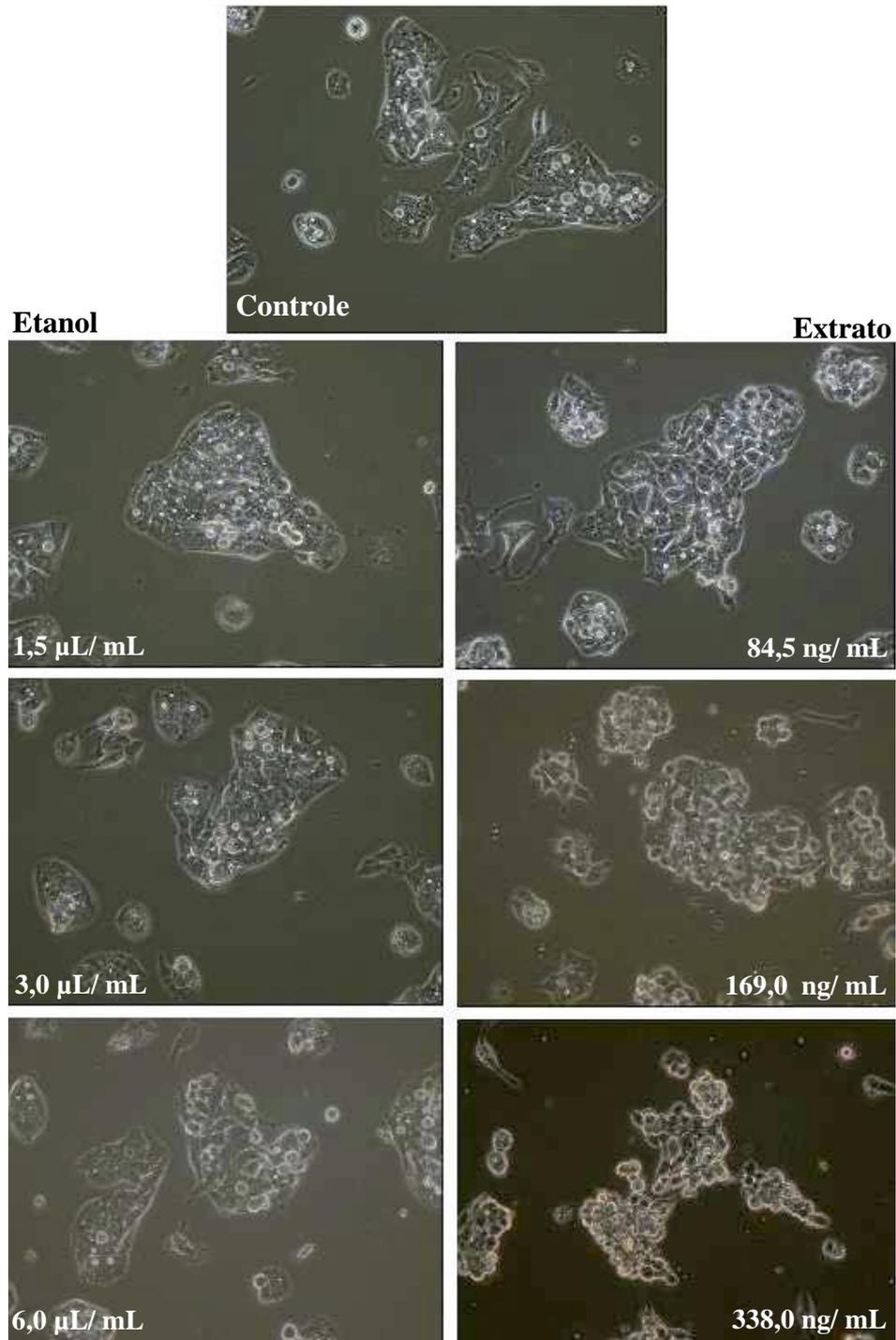


Figura 21. Microscopia de contraste de fase das células HepG2 incubadas por 1 hora com etanol (controle pareado) ou extrato hidroetanólico de resíduo da vitivinicultura concentrado por nanofiltração. As concentrações do extrato concentrado (μg de sólidos totais/ mL de meio de cultura) estão indicadas na área das fotografias. As concentrações de etanol ($\mu\text{L}/\text{mL}$ de meio de cultura; apresentadas na área das fotografias) foram pareadas àquelas usadas nas células com o extrato concentrado (controle pareado). Todas as fotografias foram registradas com aumento de 200 \times .

A Figura 22 mostra as fotos tiradas das células logo após o período de incubação de 5 horas com o extrato concentrado e com o etanol.

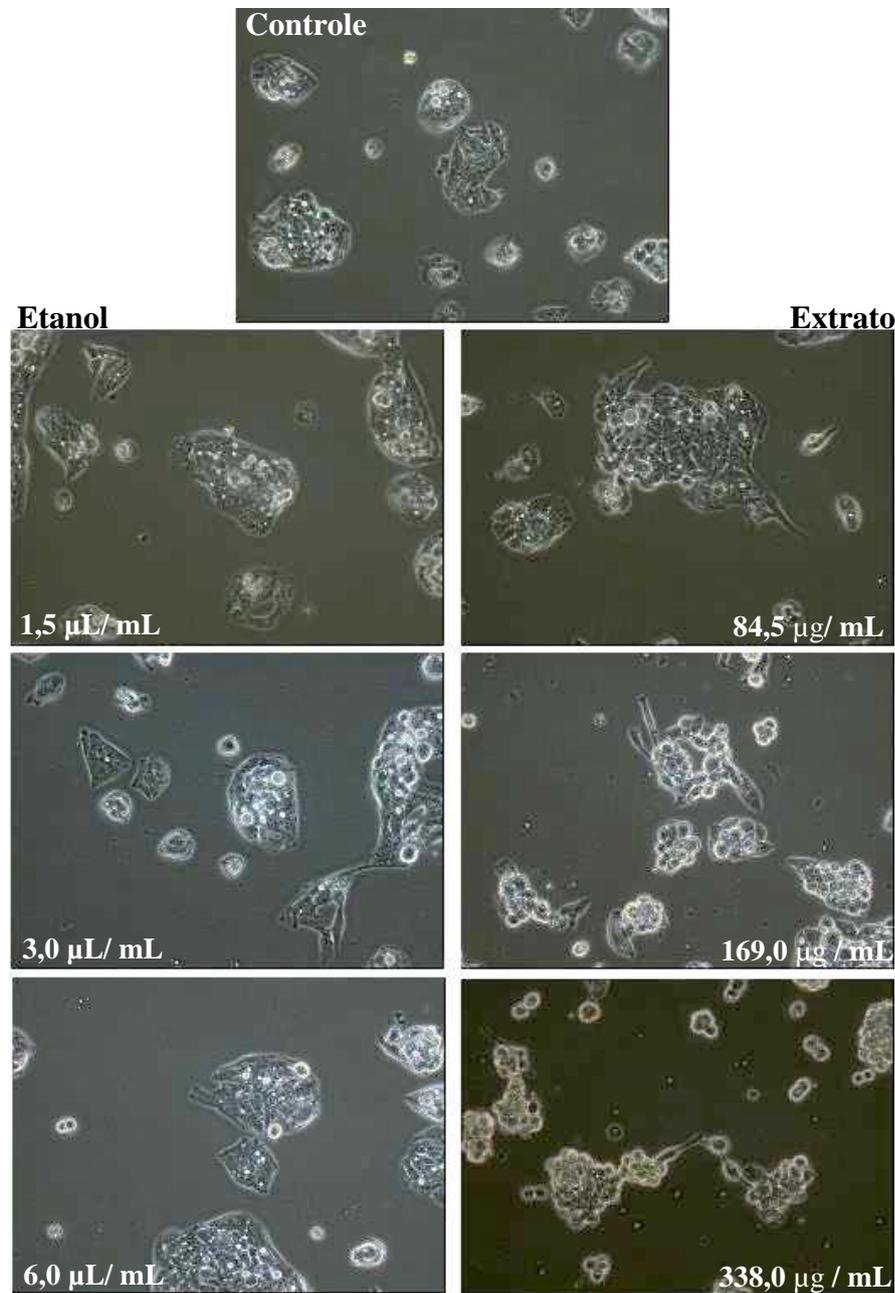


Figura 22. Microscopia de contraste de fase das células HepG2 incubadas por 5 horas com etanol (controle pareado) ou extrato hidroetanólico de resíduo da vitivinicultura concentrado por nanofiltração. As concentrações do extrato concentrado (μg de sólidos totais/ mL de meio de cultura) estão indicadas na área das fotografias. As concentrações de etanol ($\mu\text{L}/\text{mL}$ de meio de cultura; apresentadas na área das fotografias) foram pareadas àquelas usadas nas células com o extrato concentrado (controle pareado). Todas as fotografias foram registradas com aumento de $200\times$.

As fotos mostram que com o tempo de 5 horas de incubação, as células tiveram uma leve modificação na sua morfologia na concentração de 169,0 µg/ mL de sólidos totais. Na concentração mais alta de extrato (338,0 µg/ mL), a morfologia celular foi totalmente alterada, sendo observada a forma arredondada e células soltas no meio de cultura. A única condição que não alterou a forma celular de HepG2 foi na concentração mais baixa, 84,5 µg/ mL. Em todas as condições testadas do etanol, não houve modificação na morfologia celular, indicando que esse efeito na morfologia pode ser atribuído aos compostos presentes no extrato concentrado. O resultado da morfologia está de acordo com o da viabilidade celular, no qual somente a concentração mais alta do extrato concentrado foi considerada citotóxica, além desta alta concentração de sólidos totais prejudicar o metabolismo de HepG2, ela também provoca alteração morfológica. As outras concentrações de extrato concentrado testadas foram consideradas não tóxicas, pois não alterou a viabilidade celular no período de incubação de 5 horas.

A Figura 23 apresenta as fotos das células tiradas após o período de 24 horas de incubação com o extrato concentrado.

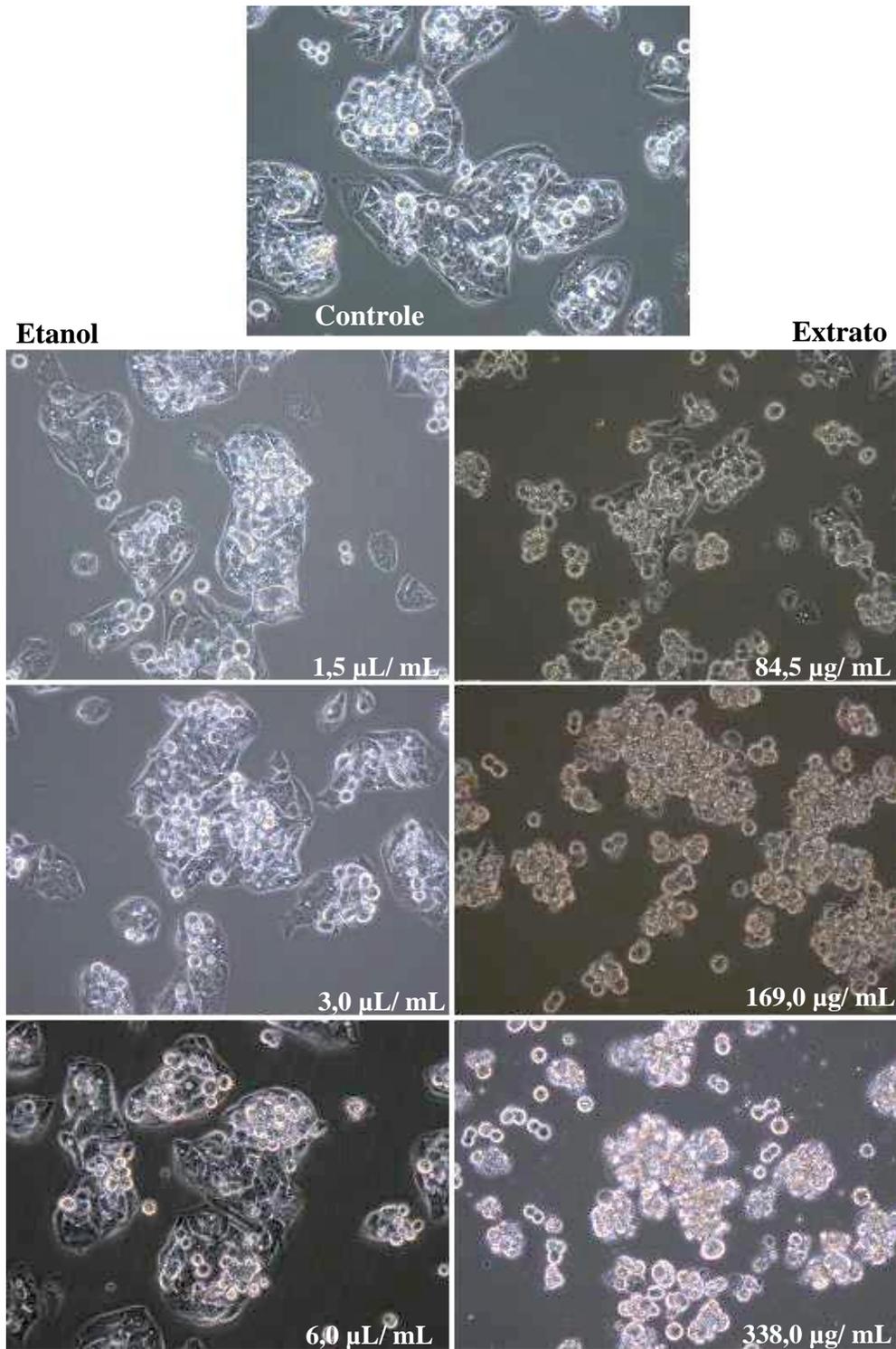


Figura 23. Microscopia de contraste de fase das células HepG2 incubadas por 24 horas com etanol (controle pareado) ou extrato hidroetanólico de resíduo da vitivinicultura concentrado por nanofiltração. As concentrações do extrato concentrado (μg de sólidos totais/mL de meio de cultura) estão indicadas na área das fotografias. As concentrações de etanol ($\mu\text{L}/\text{mL}$ de meio de cultura; apresentadas na área das fotografias) foram pareadas àquelas usadas nas células com o extrato concentrado (controle pareado). Todas as fotografias foram registradas com aumento de $200\times$.

Entre as condições testadas de etanol, nenhuma modificou a morfologia das células, corroborando os resultados de citotoxicidade (Figura 19). Podemos notar que desde a menor concentração do extrato, a morfologia de HepG2 foi modificada. Observa-se que a célula, que por natureza fica espalhada na placa, apresenta forma arredondada. Na maior concentração do extrato, 338,0 µg de sólidos totais/ mL, as células se encontravam soltas do fundo do poço. Os resultados observados durante a análise microscópica estão de acordo com os resultados da viabilidade celular, onde todas as condições testadas para o extrato concentrado se mostraram prejudiciais à atividade metabólica de HepG2.

5.2.2.3. *Ensaio de morte celular*

Foi possível verificar o efeito citotóxico do extrato concentrado nas células HepG2, levando a morte celular. Para verificar se o processo de morte celular que ocorre é o apoptótico, fizemos um ensaio com um kit Anexina V-FICT de detecção de apoptose. A Figura 24 apresenta os gráficos gerados pelo programa Cell Quest, onde podemos ver o resultado do ensaio por citometria de fluxo, após 5 horas de incubação com o extrato concentrado.

De acordo com os gráficos, conforme aumentamos a concentração do extrato, a quantidade de células necrosadas também aumenta (quadrante superior esquerdo) e o número de células em apoptose tardia (quadrante superior direito) e de células em apoptose inicial (quadrante inferior direito) diminui. Portanto, pode-se concluir que os compostos presentes no extrato concentrado levam as células HepG2 à morte. Como podemos observar nos gráficos, os compostos presentes no extrato induzem as células à morte por dois mecanismos diferentes: apoptose e necrose.

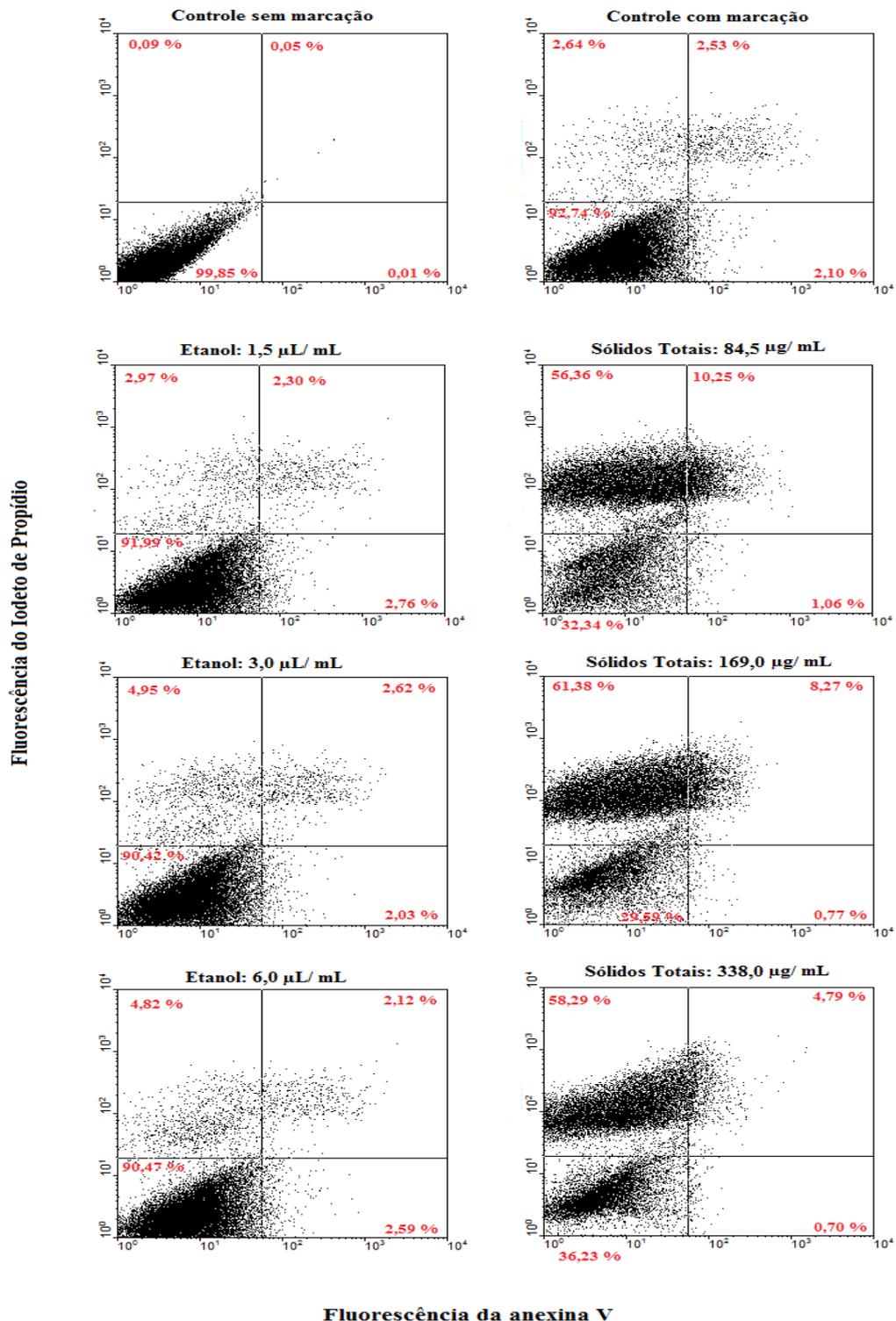


Figura 24. Ensaio de apoptose por citometria de fluxo das células HepG2 incubadas por 24 horas com o extrato de resíduo da vitivinicultura concentrado por nanofiltração. Controle sem marcação: células controle sem a marcação da Anexina-V e Iodeto de Propídio. Controle marcado: células controle marcadas com Anexina-V e Iodeto de Propídio.

As células incubadas com etanol apresentaram % de células mortas aproximado do controle, já as células incubadas com o extrato teve um número maior de morte celular, por tal motivo podemos observar que o aumento da morte celular foi proporcional ao aumento da concentração do extrato. As células marcadas para anexina-V e PI indicam estágio tardio da apoptose, que foram 10,25, 8,27 e 4,79% das células para as concentrações do extrato concentrado 84,5; 169,0 e 338,0 µg de sólidos totais/ mL, , respectivamente. As células que não foram marcadas para anexina-V, mas foram marcadas para PI, indicam que as células estão num estágio de necrose. Sánchez (2006) avaliou frações com diferentes concentrações de compostos fenólicos, e concluiu que os compostos fenólicos que estavam presentes nas frações induziram a apoptose de 9% de células A-375 (melanoma humano) e 30% de células Jurkat (leucemia). Leifert & Abeywadina (2008) analisaram o extrato integral de semente de uvas, assim como suas frações monoméricas, oligoméricas e poliméricas, e os compostos fenólicos de vinho tinto. O extrato, suas frações e os compostos fenólicos extraídos do vinho tinto mostraram induzir o processo de apoptose nas células HT29 e Caco2 (adenocarcinoma de colón humano), HuTu80 (carcinoma duodenal humano) e HepG2 (hepatocarcinoma humano). Liu *et al.* (2011) testaram um novo flavonóide, o composto DEDC, extraído pelo grupo de pesquisa dos autores da planta *Marothenlypteris torresiana*, quanto a sua capacidade de induzir as células HepG2 a apoptose. O composto DEDC na concentração de 5 µg/ mL induziu 30% das células HepG2 à apoptose, com um tempo de incubação de 4 h. Os resultados deste trabalho corroboram com os resultados encontrados por Yi *et al.* (2006), onde os autores concluíram que frações de extratos contendo antocianinas induziram células HepG2 a apoptose.

Com os resultados encontrados no presente trabalho, podemos concluir que os compostos fenólicos do extrato concentrado induz as células da linhagem HepG2 à apoptose em um pequeno período de exposição (5 horas). Porém a apoptose não é o principal mecanismo de morte celular, visto o grande número de células mortas por necrose. Este resultado é importante, uma vez que, a linhagem HepG2 possui características cancerígenas.

5.2.2.4. Ensaio de Capacidade Antioxidante Celular (CAC)

Após os testes de viabilidade celular, foram determinadas as condições de incubação com os extratos que apresentaram efeitos citotóxicos às células HepG2. Para os ensaios de CAC, escolhemos a condição de 1 hora de incubação com o EC, visto que este tempo de incubação não se mostrou citotóxico com nenhuma das 3 concentrações de extrato utilizadas.

Portanto, quaisquer efeitos sobre a CAC nesta condição, indicaria a modulação do estado redox celular pelos compostos bioativos dos extratos, sem relação com os efeitos citotóxicos. Como agente indutor das ROS, usamos a antimicina A, que é uma droga que suprime a respiração celular a partir da inibição do complexo III. A utilização da antimicina A, além de ser importante para verificar o potencial efeito antioxidante do extrato quando induzimos a produção de ROS, o é também para verificarmos se as condições do ensaio estão apropriadas, como o tempo de incubação e a recuperação de fluorescência. . Então o uso da Antimicina A proporcionou a condição máxima de estresse oxidativo da célula e a condição sem a droga foi o estado “basal” de produção de ROS A figura 25 mostra o efeito da antimicina A sobre a oxidação da sonda DCFH.

As três diferentes concentrações de etanol foram testadas (1,5; 3,0 e 6,0 $\mu\text{L}/\text{mL}$) quanto à indução do aumento da fluorescência (condição controle). Visto que não houve diferença significativa entre elas, utilizamos o valor médio das fluorescências para as análises estatísticas.

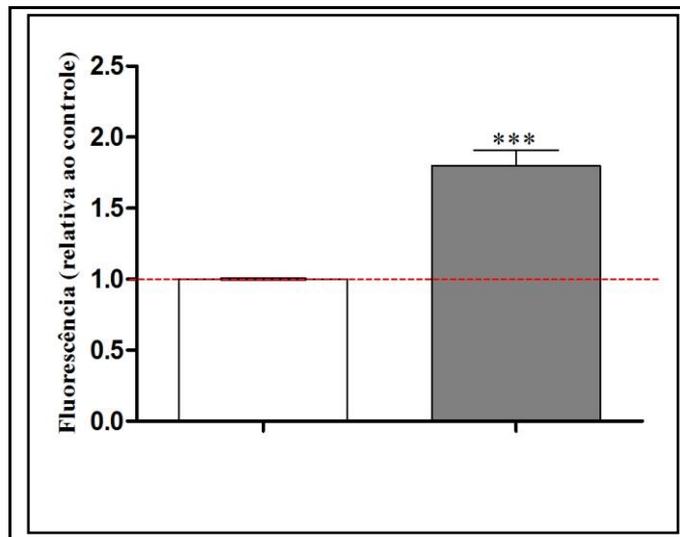


Figura 25. Antimicina A oxida a sonda fluorescente DCFH-DA, mostrando-se aplicável aos ensaios de capacidade antioxidante celular. As células HepG2 foram incubadas com 50 μM da sonda fluorescente, como descrito na Seção 4.4.5, sem (□) ou com (■) antimicina A. Os resultados foram expressos como média e erro padrão ($n=3$). ***, $p < 0,001$ (Teste- t de Student), comparado ao controle com etanol.

Foi observado que as células incubadas com a droga antimicina A, tiveram aproximadamente o dobro da produção de espécies reativas de oxigênio, sendo essa a condição máxima de estresse oxidativo da célula, se comparada com as células sem antimicina A. O resultado encontrado neste trabalho está de acordo com o encontrado por You & Park

(2010), que avaliou os efeitos da Antimicina A em células endoteliais da artéria pulmonar e em células endoteliais de umbigo, com relação à produção de ROS. Os autores chegaram à conclusão de que com o uso da Antimicina A, a produção de espécies reativas de oxigênio aumentou em 2,3 vezes. Nos resultados do trabalho de Han *et al.* (2007) foi observado a potencialização da produção de ROS, quando as células são tratadas com a Antimicina A. O resultado encontrado no presente trabalho está de acordo com o encontrado na literatura, que indica a potencialização da produção de ROS quando usada a antimicina A, garantindo a eficiência como controle positivo do ensaio.

A Figura 26 apresenta o gráfico com o resultado do ensaio de CAC na condição de produção normal de espécies reativas de oxigênio, ou seja, sem a adição da antimicina A.

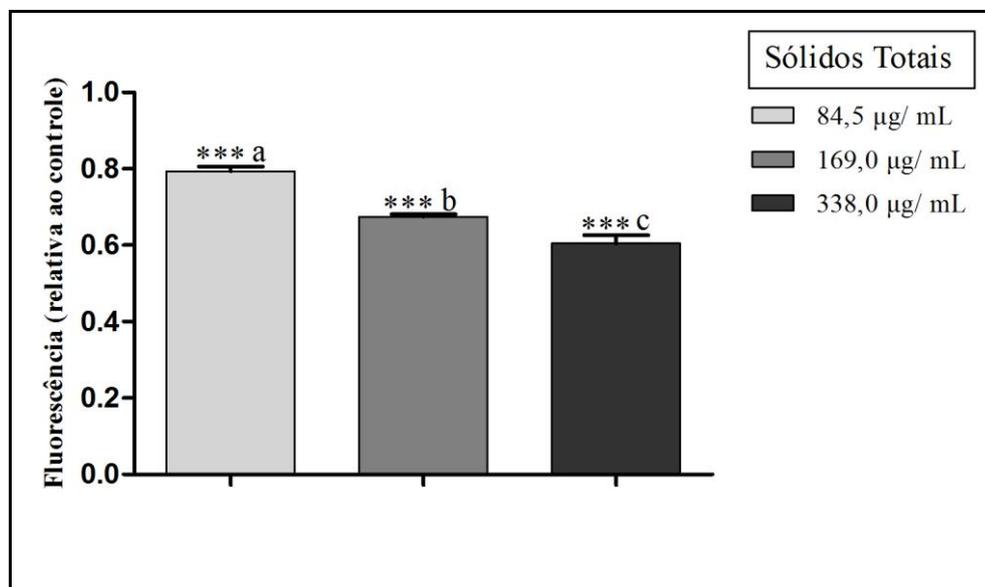


Figura 26. O extrato de resíduo da vitivinicultura concentrado por nanofiltração inibe a oxidação da sonda fluorescente DCFH-DA, no ensaio de capacidade antioxidante celular. As células HepG2 foram incubadas por 1 hora com o extrato concentrado, nas concentrações indicadas e com 50 µM de DCFH-CA, como descrito na Seção 4.4.5. Os resultados foram expressos como média e erro padrão ($n=3$). Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças significativas com a concentração imediatamente inferior de sólidos. ***, $p < 0,001$ (ANOVA com pós-teste Tukey) comparado ao seu controle pareado quanto à concentração de etanol.

Ao analisar os resultados do ensaio de atividade antioxidante celular, podemos observar houve uma menor oxidação da sonda quando as células foram incubadas com todas as concentrações do extrato concentrado, indicando um efeito antioxidante. A diminuição da fluorescência das células incubadas com o extrato concentrado foi de aproximadamente 24, 35 e 42%, nas concentrações 84,5; 169,0 e 338,0 µg de sólidos totais/ mL, respectivamente.

Podemos observar também que o efeito antioxidante do extrato aumenta de forma significativa conforme aumentamos a concentração do extrato.

Na condição de produção máxima de ROS, as células incubadas com o extrato concentrado e antimicina, tiveram redução da fluorescência em aproximadamente de 53, 60 e 58%, nas concentrações 84,5; 169,0 e 338,0 μg de sólidos totais/ mL as condições de extrato, respectivamente.

Este resultado mostra que na condição máxima de estresse oxidativo celular induzido pela presença de antimicina A, o extrato concentrado se mostrou eficiente na proteção da célula contra as espécies reativas de oxigênio. Podemos ver esse resultado na Figura 27, onde comparamos os resultados das células incubadas com o extrato concentrado com e sem antimicina.

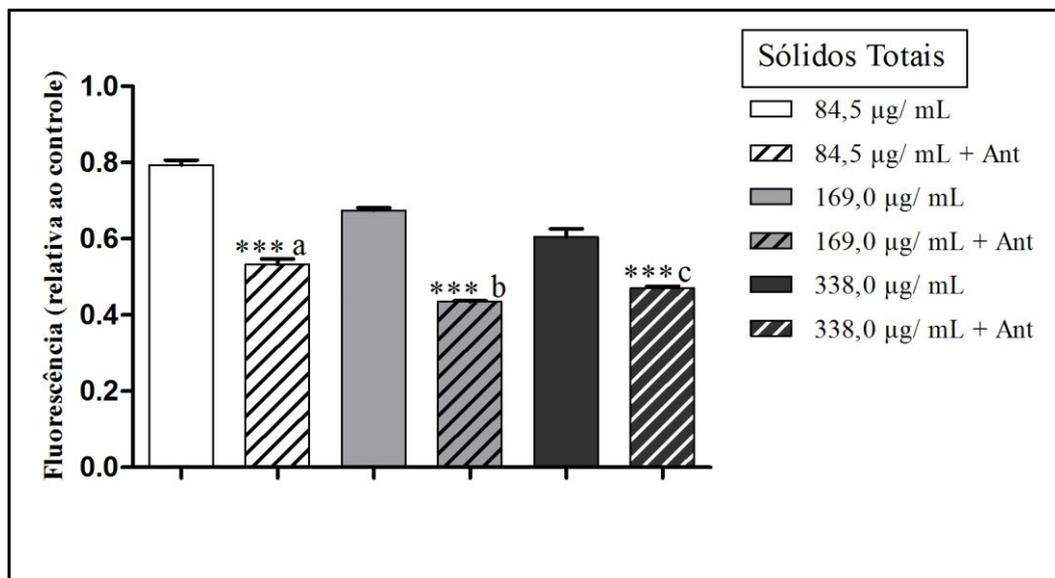


Figura 27. Efeito antioxidante do extrato de resíduo da vitivinicultura concentrado por nanofiltração é mais potente na presença do pró-oxidante antimicina A, no ensaio celular de capacidade antioxidante nas células HepG2. As células foram incubadas por 1 hora com o extrato concentrado, nas concentrações indicadas, com 50 μM da sonda fluorescente (DCFH-DA) e com antimicina A, como descrito na Seção 4.4.4. Os resultados foram expressos como média e erro padrão ($n=3$). Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças significativas comparada com a concentração de sólidos imediatamente inferior. ***, $p < 0,001$ (ANOVA com pós-teste de Tukey) comparado ao seu controle pareado.

No gráfico da comparação entre as condições sem indutor e com indutor de ROS (Figura 27), podemos ver que a ação do extrato foi mais eficiente na presença de antimicina A, pois a emissão de fluorescência foi significativamente menor que na condição normal de estresse oxidativo celular, indicando uma alta capacidade antioxidante do extrato concentrado.

Como vimos nos ensaios de viabilidade celular, o efeito do extrato se mostra dose dependente, pois ao aumentar a concentração de sólidos totais, a capacidade antioxidante também aumenta. Porém, na presença da antimicina, parece que houve saturação do extrato nas concentrações 169,0 e 338,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pois a redução na intensidade de fluorescência nessas duas concentrações foi semelhante. Por outro lado, a redução na fluorescência foi significativamente maior quando comparada à condição sem antimicina A.

Kim *et al.* (2013) tiveram como objetivo avaliar o efeito protetor de procianidinas oligomérica e polimérica de sementes de uvas em células HepG2. Este efeito foi observado em três tempos de incubação das células com os extratos contendo as frações de procianidinas, 6, 12 e 18 horas. Todas as amostras inibiram a produção de ROS de uma forma tempo dependente. Os autores concluíram que um pré-tratamento com as frações de procianidina teve efeito citoprotetor, sendo a fração, com efeito, mais significativo a de procianidinas poliméricas. Anastasiadi *et al.* (2009) analisaram extratos da uva inteira, das cascas, das sementes e de vinho. Após incubar células da linhagem do músculo liso vascular humano (HVTs-SM1) por 24 horas, foi feita a análise para verificar a quantidade de ROS intracelular. Os autores concluíram que todos os extratos diminuíram a produção de ROS intracelular, porém o efeito mais significativo quanto à diminuição de ROS foi com o extrato integral de uva, variedade Aidani. Zhang *et al.* (2013) e Kim *et al.* (2011) testaram composto de flavonóides na redução da produção de ROS intracelular, e os autores concluíram que dentre os compostos testados, o que reduziu mais a produção de ROS foi a quercetina. Os resultados do presente trabalho estão de acordo com os resultados encontrados na literatura, os quais confirmam que extratos ricos em compostos fenólicos podem proporcionar às células proteção antioxidante.

Com o intuito de comparar o efeito do extrato com um padrão utilizado em ensaios químicos de capacidade antioxidante, usamos o composto ácido gálico. A Tabela 7 apresenta a quantificação da capacidade antioxidante celular do extrato concentrado, normalizados por μmol ácido gálico $\times \text{mL}^{-1}$.

Tabela 7. Valor da capacidade antioxidante celular do extrato concentrado.

Extrato	Capacidade antioxidante celular (CAC)
	($\mu\text{mol EAG/ 100 g de extrato}$ média \pm EP)
EC1	8820 \pm 40,02
EC2	9643 \pm 39,15
EC3	10456 \pm 41,07

EC: Extrato Concentrado; EC 1: 84,5 $\mu\text{g/ mL}$; EC 2: 169,0 $\mu\text{g/ mL}$; EC 3: 338,0 $\mu\text{g/ mL}$.

Baseados nos resultados encontrados neste trabalho e os resultados dos trabalhos citados, podemos concluir que o extrato concentrado, no tempo de incubação de 1 hora, reduz a produção de ROS, devido à presença de compostos bioativos no extrato.

Analisando os resultados em conjunto, observamos que no período de 1 hora, o extrato não exerce efeito sobre a viabilidade e por outro lado aumenta a CAC das células HepG2. Em contrapartida, tempos superiores de incubação promovem uma diminuição tempo e concentração dependente, da viabilidade e indução de morte. Visto que o aumento da CAC reflete uma maior proteção contra danos oxidativos tanto pela diminuição na produção como no aumento no poder de eliminação de ROS, podemos sugerir que essas espécies apresentam um papel modulador importante na proliferação e sinalização das células HepG2, conforme já sugerido (de Oliveira *et al.*, 2012). Apesar de à princípio o aumento da CAC sugerir um aumento da sobrevivência celular das células HepG2, uma menor produção e/ou sinalização por ROS desencadeou os efeitos citotóxicos e de morte observados nos tempos de incubação superiores. Os efeitos do extrato sobre a CAC nesses tempos superiores de incubação necessitam ser avaliados.

Uma questão importante no que tange a aplicação de extratos de alimentos (e compostos bioativos) em ensaios clínicos como agentes anticâncer, envolve os estudos dos efeitos em células normais não cancerosas. Neste sentido, avaliamos a citotoxicidade do extrato concentrado em células de fibroblastos humanos BEAS após 5 e 24 horas de incubação. Como pode ser observado nas figuras 28 e 29, após 5 horas de incubação, a viabilidade celular não foi afetada em nenhuma das concentrações de extrato testadas. Da

mesma forma, após 24 horas de incubação, com 84,5 e 169,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de extrato, a viabilidade das células BEAS não foi afetada. Somente com a concentração de 338,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, observamos uma redução de 15% na viabilidade celular. Esses resultados indicam um efeito seletivo do extrato concentrado de resíduo da vitivinicultura nas células de hepatocarcinoma humano, indicando seu potencial para desenvolvimento de produtos com aplicação nutracêutica e anticâncer.

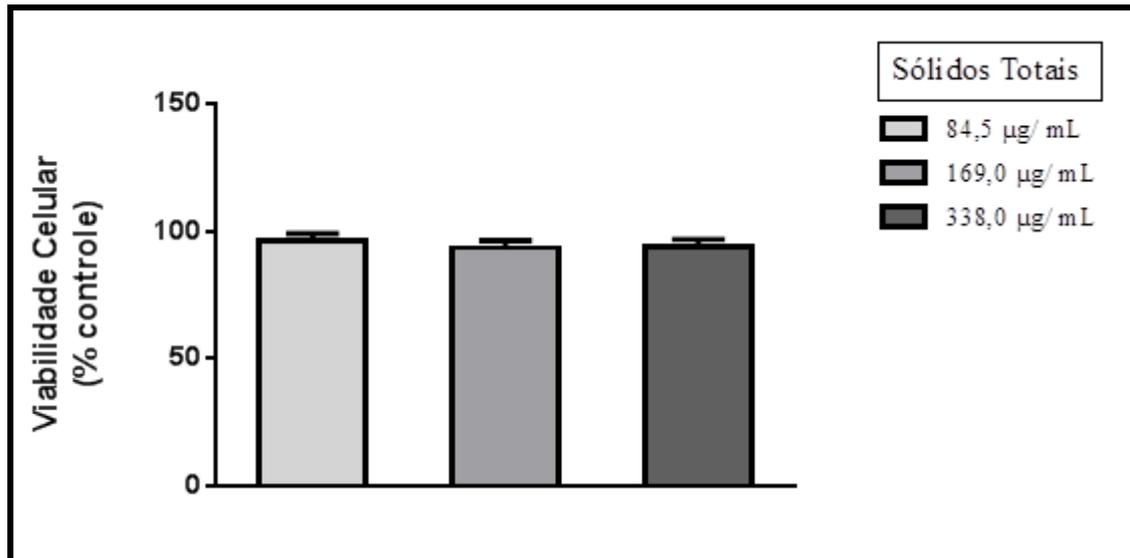


Figura 28. Efeito do extrato de resíduo da vitivinicultura concentrado por nanofiltração sobre a viabilidade celular da linhagem BEAS (5 h). As células foram incubadas por 5 horas com o extrato concentrado, nas concentrações indicadas e a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de redução do CellTiter Blue, como descrito na Seção 4.4.2. Os resultados foram expressos como média e erro padrão ($n=6$). Não houve diferenças significativas entre as condições testadas; (ANOVA com pós-teste de Tukey), comparado ao seu controle pareado quanto à concentração de etanol.

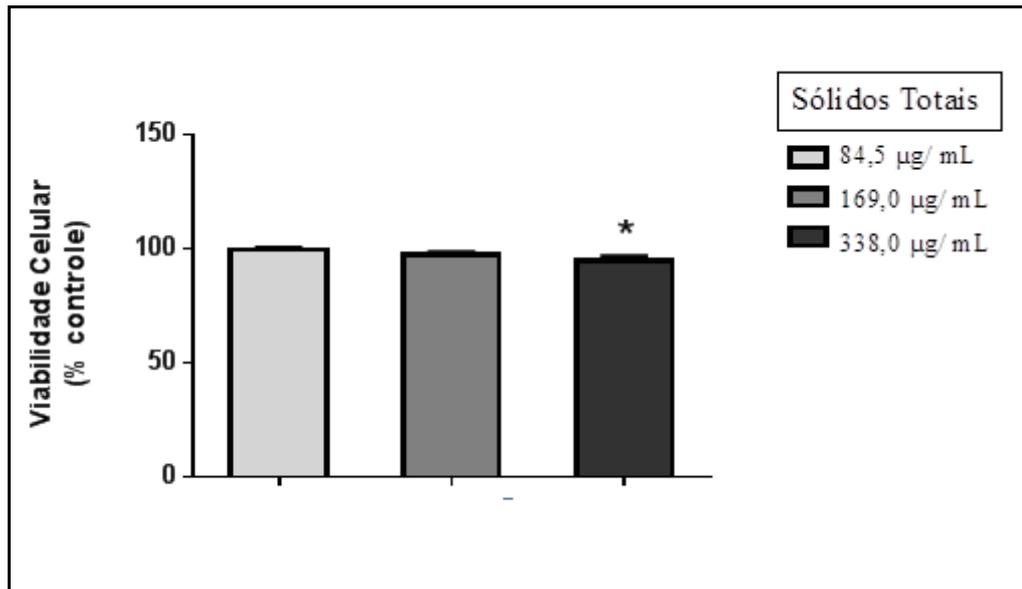


Figura 29. Efeito do extrato de resíduo da vitivinicultura concentrado por nanofiltração sobre a viabilidade celular da linhagem BEAS (24 h). As células foram incubadas por 24 horas com o extrato concentrado, nas concentrações indicadas e a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de redução do CellTiter Blue, como descrito na Seção 4.4.2. Os resultados foram expressos como média e erro padrão ($n=6$). Não houve diferenças significativas entre as condições 84,5 e 169 ng/mL e seus respectivos controles pareados; (ANOVA com pós-teste de Tukey). Na concentração 338 ng/mL, houve diferença significativa ($P<0,05$), comparado ao controle pareado.

6. CONCLUSÕES

Mesmo após o processamento para a produção de vinho e derivados, o bagaço constituído principalmente pela casca e semente possui um alto teor de compostos bioativos. Desta forma com a extração adequada para a obtenção destes compostos, um destino melhor pode ser dado ao resíduo.

O extrato concentrado teve maior capacidade antioxidante e maior conteúdo de compostos antioxidantes, como já era esperado, pois se trata de um extrato concentrado, mostrando que o processamento realizado foi eficiente para a concentração do extrato de bagaço da uva, conservando seus compostos bioativos e sua atividade antioxidante, podendo ser aplicado após a extração.

Os ensaios celulares mostraram que a solução de etanol 30%, solução na qual foi realizada a extração dos compostos bioativos do bagaço, não interferiu nos resultados das análises, concluindo que todos os efeitos observados são devido à presença dos compostos bioativos do extrato concentrado.

Com os resultados da viabilidade celular, definimos a melhor condição para se realizar o ensaio de atividade antioxidante celular, que é com as concentrações do extrato concentrado de 84,5 µg/ mL; 169,0 µg/ mL; 338,0 µg/ mL por 1 hora de incubação, pois esta condição não afetou a viabilidade celular de HepG2.

A incubação com o extrato por mais de 1 hora, induziu as células à morte. Os compostos presentes no extrato induziram as células à morte tanto por apoptose quanto por necrose, o que é bom, pois é a linhagem HepG2 possui características cancerígenas. Esses resultados indicam possível bioatividade dos extratos ligada à prevenção do câncer e que os compostos presentes no extrato podem induzir de diferentes formas a morte celular de HepG2. Porém é necessário estudar por quais vias os compostos presentes no extrato atuam nas células HepG2.

Os resultados do ensaio de capacidade antioxidante celular mostraram que houve menor oxidação da fluoresceína nas células incubadas com o extrato concentrado, tanto na condição normal de estresse oxidativo celular quanto na condição máxima de estresse oxidativo, mostrando-se mais eficaz na condição de maior produção de espécies reativas de oxigênio. Com este resultado, concluímos que o aumento da CAC pode ter contribuído para os efeitos citotóxicos nas células HepG2 nos períodos de 5 e 24 de incubação. Portanto, ROS parecem exercer um efeito sinalizador para proliferação das células de câncer.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe, L. T., Da Mota, R. V., Lajolo, F. M., Genovese, M. I. **Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinífera* L.** *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 27, n°2, p. 394-400, 2007.
- Ali, S. S., Kasoju, N., Luthra, A., Singh, A., Sharanabasava, H., Sahu, A., Bora, U. **Indian medicinal herbs as sources of antioxidants.** *Food Research International*, v. 41, p. 1-15, 2008.
- Alía, M., Mateos, R., Ramos, S., Lecumberri, E., Bravo, L., Goya, L. **Influence of quercetin and rutin on growth and antioxidant defense system of a human hepatoma cell line (HepG2).** *European Journal of Nutrition*, v. 45, p. 19-28, 2006.
- Almeida, M. M. B., Souza, P. H. M., Arriaga, A. M. C., Prado, G. M., Magalhães, C. E. C., Maia, G. A., Lemos, T. L. G. **Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil.** *Food Research International*, v. 44, p. 2155-2159, 2011.
- Anastasiadi, M., Pratsinis, H., Kletsas, D., Skaltsounis, A., Haroutounian, S. a. **Bioactive non-coloured polyphenols content of grape, wines and vinification by-products: Evaluation of antioxidant activities of their extracts.** *Food Research International*, v. 43, p. 805-813, 2010.
- Arnous, A., Meyer, A. S. **Comparison of methods for compositional characterization of grape (*Vitis vinifera* L.) and apple (*Malus domestica*) skins.** *Food and Bioproducts Processing*, v. 86, p. 79-86, 2008.
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., Omar, A. K. M. **Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review.** *Journal of Food Engineering*, v. 117, p. 426-436, 2013.
- Bakkalbasi, E., Yemis, O., Aslanova, D., Artik, N. **Major flavan-3-ol composition and antioxidant activity of seeds from different grape cultivars grown in Turkey.** *European Food Research and Technology*, v. 221, p. 792-797, 2005.
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. **Phenolic compounds in plants and agricultural by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses.** *Food Chemistry*, v. 99, p.191-203, 2006.
- Balu, M., Sangeetha, P., Haripriya, D., Panneerselvam, C. **Rejuvenation of antioxidant system in central nervous system of aged rats by grape seed extract.** *Neuroscience Letters*, v. 383, p. 295-300, 2005.
- Balu, M., Sangeetha, P., Murali, G., Panneerselvam, C. **Modulatory role of grape seed extract on age-related oxidative DNA damage central nervous system of rats.** *Brain Research Bulletin*, v. 68, p. 469-473, 2006.

- Bartosz, G., Janaszewska, A., Ertel, D., Bartosz, M. **Simple determination of peroxy radical trapping capacity**. *Biochemistry and Molecular Biology International*, v.46 n.3, p. 519 – 528, 1998.
- Bergamashi, K.B. **Capacidade antioxidante e composição química de resíduos vegetais visando seu aproveitamento**. 2010. 97p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimento) – Universidade de São Paulo.
- Bernhoft, A., 2010. **A brief review on bioactive compounds in plants**. In: Proceedings from a symposium held at The Norwegian Academy of Science and Letters, Oslo, Norway.
- Blasa, M., Angelino, D., Gennari, L., Ninfali, P. **The cellular antioxidant activity in red blood cells (CAA-RBC): a new approach to bioavailability and synergy of phytochemical and botanical extracts**. *Food Chemistry*, v. 125, p. 685-691, 2011.
- Bleve, M., Ciurlia, L., Erroi, E., Lionetto, G., Longo, L., Rescio, L., Schettino, T., Vasapollo, G. **An innovative method for the purification of anthocyanins from grape skin extracts by using liquid and sub-critical carbon dioxide**. *Separation and Purification Technology*, v. 64, p. 192-197, 2008.
- Bralley, E. E., Hargove, J. L., Greenspan, P., Hartle, D. K. **Topical anti-inflammatory activities of vitis rotundifolia (Muscadine grape) extracts in the tetradecanoylphorbol acetate model of ear inflammation**. *Journal of Medicinal Food*, v. 4, p. 636-642, 2007.
- Brito, E. S., De Araújo, M.C.P., Alves, R.E., Carkeet, C., Clevidence, B.A., Novotny, J.A. **Anthocyanins present in selected tropical fruits: Acerola, Jambolão, Jussara and Guajiru**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, p. 9389-9394, 2007.
- Bucic-Kojic, A., Planinic, M., Tomas, S., Bilic, M., Velic, D. **Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds**. *Journal of Food Engineering*, v. 81, p. 236-242, 2007.
- Bucic-Kojic, A., Sovová, H., Planinic, M., Tomas, S. **Temperature-dependent kinetics of grape seed phenolic compounds extraction: experiment and model**. *Food Chemistry*, v. 136, p. 1136-1140, 2013.
- Budak, H. N. & Guzel-Seydim, Z. B. **Antioxidant activity and phenolic content of wine vinegars produced by two different techniques**. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 90, p. 2021-2026, 2010.
- Cameron, R. G., Neuman, M. G., Shear, N. H., Katz, G., Bellentani, S., Tiribelli, C. **Modulation of liver-specific cellular response to ethanol *in vitro* in HepG2 cells**. *Toxicology in Vitro*, v. 12, p. 111-122, 1998.
- Campos, L.M.A.S. **Obtenção de extratos de bagaço de uva cabernet sauvignon (*Vitis vinífera*): parâmetros de processo e modelagem matemática**. 2005. 141p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina.

- Caroch, M., Ferreira, I. C. F. R. **A review on antioxidante, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives.** Food and Chemical Toxicology, v. 51, p. 15-25, 2013.
- Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M. L., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A., Galán-Vidal, C. A. **Chemical studies of anthocyanins: A review.** Food Chemistry, v. 113, p. 859-871, 2009.
- Castillo-Muñoz, N., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., Hermosín-Gutiérrez, I. **Flavonol profiles of Vitis vinífera red grape and their single-cultivar wines.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 55, p. 992-1002, 2007.
- Castillo-Muñoz, N., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., Gómez, M. V., Velders, A. H., Hermosín-Gutiérrez, I. **Flavonol 3-O-glycosides series of Vitis vinífera Cv. Petit verdot red wine grapes.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 57, p. 209-219, 2009.
- Cataneo, C.B., Caliar, V., Gonzaga, L.V., Kuskoski, E.M., Fett, R. **Atividade antioxidante e conteúdo fenólico do resíduo agroindustrial da produção de vinho.** Semina: Ciências Agrárias, Londrina. Vol. 29, nº1, p. 93-102. Jan/Mar 2008.
- Chacón, M. R., Ceperuelo-Mallafre, V., Maymó-Masip, E., Mateo-Sanz, J. M., Arola, L., Guitierrez, C., Fernandez-Real, J. M., Ardévol, A., Simón, I., Vendrell, J. **Grape-seed procyanidins modulate inflammation on human differentiated adipocytes in vitro.** Cytokine, v. 47, p. 137-142, 2009.
- Chamorro, S., Goñi, I., Viveros, A., Hervvert-Hernández, D., Brenes, A. **Changes in polyphenoliccontent and antioxidant activity after thermal treatments of grape seed and grape pomace.** European Food Research and Technology, v. 234, p. 147-155, 2012.
- Cliff, M. A., King, M. C., Schlosser, J. **Anthocyanin, phenolic composition, colour measurement and sensory analysis of BC commercial red wines.** Food Research International, v. 40, p. 92-100, 2007.
- Crespo, I., García-Mediavilla, M. V., Almar, M., González, P., Tuñón, M. J., Sánchez-Campos, S., González-Gallego, J. **Differential effects of dietary flavonoids on reactive oxygen and nitrogen species generation and changes in antioxidante enzyme expression. Induced by proinflammatory cytokines in Chang Liver cells.** Food and Chemical Toxicology, v. 46, p. 1555-1569, 2008.
- Croteau, R., Kutchan, T. M., Lewis, N. G. **Natural products (secondary metabolites).** Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Phyiologists, Rockville, MD, p. 1250-1318, 2000.
- Cruz, A. P. G. **Avaliação do efeito da extração e da microfiltração do açaí sobre sua composição e atividade antioxidante.** 2008. 104 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal do Rio de Janeiro.

- Cruz, A. P. G. **Recuperação de compostos bioativos a partir de resíduos da indústria vitivinícola**. 2013. 230 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- de Oliveira, M. F., Amoêdo, N. D., Rumjanek, F. D. **Energy and redox homeostasis in tumor cells**. *Int J Cell Biol*. 2012:593838.
- Dai, J., Mumper, R. J. **Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidante and anticancer properties**. *Molecules*, v. 15, p. 7313-7352, 2010.
- D'Archivio, M., Filise, C., Vari, R., Scazzochio, B., Masella, R. **Bioavailability of the polyphenols: status and controversies**. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 11, p. 1321-1242, 2010.
- Einbond, L. S., Reynertson, K. A., Luo, X., Basile, M. J., Kennelly, E. J. **Anthocyanin antioxidant from edible fruits**. *Food Chemistry*, v. 84, p. 23-38, 2004.
- Falchi, M., Bertelli, A., Scalzo, R. L., Morassut, M., Morelli, R., Das, S., Cui, J., Das, D. K. **Comparison of cardioprotective abilities between the flesh and skin of grape**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, p. 6613-662, 2006.
- Francis, F.J. **Anthocyanins and beralains: composition and applications**. *Cereal Foods World*. Vol. 45, p.834-838, 1998.
- Fu, L., Xu, B., Xu, X., Gan, R., Zhang, Y., Xia, E., Li, H. **Antioxidant capacities and total phenolic contentes of 62 fruits**. *Food Chemistry*, v. 129, p. 345-350, 2011.
- García-Alonso, J., Ros, G., Periago, M. J. **Antiproliferative and cytoprotective activities of a phenolic-rich juice in HepG2 cells**. *Food Research International*, v. 39, p. 982-991, 2006.
- Georgé, S., Brat, P., Alter, P., Amiot, M.J. **Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, p. 1370-1373, 2005.
- Gerlier, D., Thomasset, N. **Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation**. *Journal of Immunological Methods*, v. 94, p. 57-63, 1986.
- Giusti, M. M. and Wrolstad, R. E. **Characterization and mesasurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy**. In WROLSTAD, R. E. (Ed.). *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. New York: Wiley, 2001.
- Halliwell, B. **Biochemistry of oxidative stress**. *Biochemistry Society Transactions*, v. 35, p. 1147-1150, 2007.
- Ham, Y. W., Kim, S. Z., Kim, S. H., Park, W. H. **The changes of intracellular H₂O₂ are an important factor maintaining mitochondria membrane potential of antimycin A-treated As4.1 juxtglomerular**. *Biochemical Pharmacology*, v. 73, p. 863-872, 2007.

- Haminiuk, C. W. I., Maciel, G. M., Plata-Oviedo, M. S. V., Peralta, R. M. **Phenolic compounds in fruits – na overview**. *Internacional Journal of Food Science and Technology*, v. 47, p. 2023-2044, 2012.
- Heo, D., Park, J., Hata, K., Day, R., Herberman, R. B., Whiteside, T. L. **Evaluation of tetrazolium-baese semiautomatic colorimetric assay for measurement of human antitumor cytotoxicity**. *Cancer Research*, v. 50, p. 3681-3690, 1990.
- Hogan, S., Zhang, L., Li, J., Zoecklein, B., Zhou, K. **Antioxidant properties and bioactive components of Norton (*Vitis aestivalis*) and Cabernet Franc (*Vitis vinifera*) wine grapes**. *LWT – Food Science and Technology*, v. 42, p. 1269-1274, 2009.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R. **The chemistry behind antioxidant capacity assays**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, p. 1841-1856, 2005.
- Ignat, I., Volf, I., Popa, V. I. **A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables**. *Food chemistry*, v. 126, p. 1821-1835, 2011.
- Kao, T., Chen, B. **Functional components in soybean cake and their effects on antioxidant activity**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, p. 7544-7555, 2006.
- Kapasakalidis, P. G., Rastall, R. A., Gordon, M. H. **Extraction of polyphenols from processed black currant (*Ribes nigrum* L.) residues**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, p. 4016-4021, 2006.
- Khlebnikov, A. /i., /schepetkin, I. A., Domina, N. G., Kirpotina, L. N., Quinn, M. T. **Improved quantitative structure-activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems**. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 15, p. 1749-1770, 2007.
- Kim, G., Kwon, Y., Jang, H. **Protective mechanism of quercetin and rutin on 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride or Cu²⁺-induced oxidative stress in HepG2 cells**. *Toxicology in Vitro*, v. 25, p. 138-144, 2011.
- Kim, S.Y., Jeong, S.M., Park, W.P., Nam, K. C., Ahn, D. U., Lee, S. C. **Effect of heating conditions of grape seeds on the antioxidant activity of grape seeds extracts**. *Food Chemistry*, v. 97, p. 472-479, 2006.
- Kim, Y., Choi, Y., ham, H., Jeong, H., Lee., J. **Protective effects of oligomeric and polymeric fractions from defatted grape seeds on tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative damage in HepG2 cells**. *Food Chemistry*, v. 137, p. 136-141, 2013.
- Kris-Etherton, P. M., Hecker, K. D., Bonamone, A., Coval, S. M., Binkoski, A. E., Hilpert, K. F., Griel, A. E., Etherton, T. D. **Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer**. *The American Journal of Medicine*, v. 113 (9B), p. 71S-88S, 2002.

- Lafka, T. I., Sinanoglou, V., Lazos, E. S. **On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes.** Food Chemistry, v. 104, p. 1206-1214, 2007.
- Lapornik, B., Prosek, M., Wondra, A. G. **Comparison of extracts prepared from plant by-products using solvents and extraction time.** Journal of Food Engineering, v. 71, p. 214-222, 2005.
- Lee, S. C., Kim, J. H., Jeongs, M., Kim, D. R., Ha J., Nam, K. C. **Effect of far-infrared radiation on the antioxidant activity of rice hulls.** Journal of Agricultural and Food chemistry, v. 51, n°.15, p. 4400-4403, 2003.
- Leifert, W. R. & Abeywardena, M. Y. **Grape seed and red wine polyphenol extracts inhibit cellular cholesterol uptake, cell proliferation, and 5-lipoxygenase activity.** Nutrition Research, v. 28, p. 842-850, 2008.
- Li Fu; Bo-Tao Xu; Xiang-Rong Xu; Ren-You Gan; Yuan Zhang; Em-Qin Xia; Hua-Bin Li. **Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits.** Food Chemistry, v. 129, p. 345-350, 2011.
- Liu, A. A. **Comparative compositional and biological properties of Muscadine and Cabernet franc grape skins.** 2009, 106 p. Thesis of Master of Science – North Carolina State University.
- Liu, R. H., Finley, J. **Potential cell culture models for antioxidant research.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 53, p. 4311-4314, 2005.
- Liu, M., Liu, H., Song, B., Li, C., Lin, L., Zhang, C., Zhao, J., Liu, J. **Antiangiogenic effects of 4 varieties of grapes in vitro.** Journal of Food Science, v. 75 (6), p. 99-104, 2010.
- Liu, H., Xiao, Y., Xiong, C., Wei, A., Ruan, J. **Apoptosis induced by a new flavonoid in human hepatoma HepG2 cells involves reactive oxygen species-mediated mitochondrial dysfunction and MAPK activation.** European Journal of Pharmacology, v. 654, p. 209-216, 2011.
- López-Alarcón, C., Denicola, A. **Evaluating the antioxidant capacity of natural products: a review on chemical and cellular-based assays.** Analytica Chimica Acta, v. 763, p. 1-10, 2013.
- Lu, Y., Foo, L. Y. **The polyphenol constituents of grape pomace.** Food Chemistry, v. 65, p. 1-8, 1999.
- Luque-Rodriguez, J. M., Castro, M. D. L., Pérez-Juan, P. **Dynamic superheated liquid extraction of anthocyanins and other phenolics from red grape skins of winemaking residues.** Bioresource Technology, n. 98, p. 2705-2713, 2007.
- Magalhães, L. M., Almeida, M. I. G. S., Barreiros, L., Reis, S., Segundo, M. A. **Automatic aluminium chloride method for routine estimation of total flavonoids in red wines and teas.** Food Analytical Methods, v. 5, p. 530-539, 2012.

- Maier, T., Göppert, A., Kammerer, D. R., Schieber, A., Carle, R. **Optimization of a process for enzyme-assisted pigment extraction from grape (*Vitis vinifera* L.) pomace.** European Food Research and Technology, v. 227, p. 267-275, 2008.
- Malacrida, C.R., Motta, S. **Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas. Vol.25, nº4, p.659-664. Out/Dez 2005.
- Merken, H. M., Beecher, G. R. **Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 48 (3), p. 577-599, 2000.
- Montealegre, R. R., Peces, R. R., Vozmediano, J. L. C., Gascueña, J. M., Romero, E. G. **Phenolic compounds in skins and seeds of tem grape *Vitis vinífera* varieties grown in a warm climate.** Journal of Food Composition and Analysis, v. 19, p. 687-693, 2006.
- Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Domínguez, J. M., Sineiro, J., Domínguez, H., Núñez, M. J., Parajó, J. C. **Natural antioxidants from residual sources.** Food Chemistry, v. 72, p. 145-171, 2001.
- Murga, R., Ruiz, R., Beltran, S., Cabezas, J.L. **Extraction of natural complex phenols and tannins from grape seeds by using supercritical mixtures of carbon dioxide and alcohol.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 48, nº8, p. 3408-3412, 2000.
- Naczek, M., Shahidi, F. **Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 41, p. 1523-1542, 2006.
- Negro, C.; Tommasi, L.; Micelli, A. **Phenolic compounds and antioxidante activity from red grape marc extracts.** Bioresource Technology, v. 87, p. 41-44, 2003.
- Neuman, M. G., Koren, G., Tiribelli, C. **In vitro assessment of the ethanol-induced hepatotoxicity on HepG2 cell line.** Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 2, p. 932-942, 1993.
- Niki, E. **Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo.** Free Radical & Medicine, v. 49, p. 503-515, 2010.
- Novak, I., Janeiro, P., Seruga, M., Oliveira-Brett, A. M. **Ultrasound extracted flavonoids from four varieties of Portuguese red grape skins determined by reverse-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection.** Analytica Chimica Acta, v. 630, p. 107-115, 2008.
- Olas, B. Wachowicz, B., Nowak, P., Tomczak, A., Stochmal, A., Oleszek, W., Jeziorski, A., Piekarski, J. **Studies on antioxidant properties of polyphenol-rich extract from berries of *Aronia melanocarpa* in blood platelets.** Journal of Physiology and Pharmacology, v. 59, p. 823-835, 2008.

- Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., Deemer, E. K. **Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 50, p. 3122-3128, 2002.
- Panico, A. M., Cardille, V., Avondo, S., Garufi, F., Gentile B., Puglia, C., Bonina, F., Santagati, N. A., Ronsisvalle, G. **The in vitro effect of a lyophilized extract of wine obtained from Jacquez grapes on human chondrocytes.** Phytomedicine, v. 13, p. 522-526, 2006.
- Pec, M. K.; Aguirre, A.; Moser-Their, K.; , Fernández, J. J.; Souto, M. L.; Dorta, J.; González, F. D.; Villar, J. **Induction of apoptosis in estrogen dependent and independent breast cancer cells by the marine terpenoid dehydrothysiferol.** Biochemical Pharmacology, v. 65, p. 1451–1461, 2003.
- Pelegrini, N., Serafini, M., Colombi, B., Del Rio, D., Salvatore, S., Bianchi, M., Brighenti, F. **Total antioxidant capacity of plants foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays.** The Journal of Nutrition, v. 133, p. 2812-2819, 2003.
- Perales, S., Barberá, R., Lagarda, M.J., Farré, R. **Antioxidant capacity of infant fruit beverages; influence of storage and in vitro gastrointestinal.** Nutrición Hospitalaria. V23, nº: 6, p.547-533, 2008.
- Pinelo, M., Arnous, A., Meyer, a. S. **Upgrading of grape skins: significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release.** Trends in Food Science & Technology, v. 17, p. 579-590, 2006.
- Pokorny, J. **Natural antioxidants for food use.** Trends in Food Science and Technology, Cambridge. Vol. 2, p. 223-227. Sept. 1991.
- Protas, J. F. S., Camargo, U. A., Melo, L. M. R. **A vitivinicultura brasileira: realidade e perspectivas.** <http://www.cnpv.embrapa.br/publica/artigos/vitivinicultura/> (acesso em 05/02/2013).
- Ramos, A. A., Lima, C. F., Pereira, M. L., Fernandes-Ferreira, M., Pereira-Wilson, C. **Antigenotoxic effects of quercetin, rutin and ursolic acid on HepG2 cells: Evaluation by the comet assay.** Toxicology Letters, v. 177, p. 66-73, 2008.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., rice-evans, C. **Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay.** Free Radical Biology & Medicine, v. 26, nos. 9/10, p. 1231–1237, 1999.
- Rockenbach, I. I. **Compostos fenólicos, ácidos graxos e capacidade antioxidante do bagaço de vinificação de uvas tintas (*Vitis vinífera* L. e *Vitis labrusca* L.).** 2008, 113p. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina.
- Rockenbach, I. I., Rodrigues, E., Gonzaga, L. V., Caliari, V., Genovese, M. I., Gonçalves, A. E. S. S., Fett, R. **Phenolic compounds content and antioxidant**

activity in pomace from selected red grapes (*Vitis vinífera* L. and *Vitis labrusca* L.) widely produced in Brazil. Food Chemistry, v. 127, p. 174-179, 2011.

- Rodriguez-Amaya, D. B. **Quantitative analysis, in vitro assessment of bioavailability and antioxidant activity of food carotenoids – a review.** Journal of Food Composition and Analysis, v. 23, p. 726-740, 2010.
- Rufino, M.S.M., Alves, R.E., Brito, E.S., Morais, S.M., Sampaio, C.G., Pérez-Gimenez, J., Saura-Calixto, F.D. **Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical ABTS^{•+}.** Comunicado Técnico (Embrapa Agroindústria Tropical), 2007.
- Sánchez, C. M. **Polyphenolic fractions from wine by-products as potential antitumoral and/or protective agents against UV damage.** 2006. 162 p. Tese de Doutorado – Instituto de Investigações Químicas e Ambientais de Barcelona, Universidade de Barcelona.
- Scoparo, C. T. **Efeitos da hispidulina sobre o metabolismo oxidativo e a viabilidade celular de hepatoma humano (HepG2).** 2012. 93p. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica do Setor de Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Paraná.
- Seeram, N.P.; Aviram, M.; Zhang, Y.; Henning, S.M.; Feng, L.; Dreher, M.; Heber, D. **Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the United States.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 56, p. 1415-1422, 2008.
- Selani, M.M. **Extrato de bagaço de uva como antioxidante natural em carne de frango processada e armazenada sob congelamento.** 2010. 101p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade de São Paulo.
- Serafini, M., Maiani, G., Ferro-Luzzi, A. **Alcohol-Free red wine enhances plasma antioxidante capacity in humans.** The Journal of Nutrition, v. 128, p. 1003-1007, 1998.
- Shanmuganayagam, D., Warner, T. F., Krueger, C., G., Reed, J. D., Folts, J. D. **Concord grape juice attenuates platelet aggregation, serum cholesterol and development of atheroma in hypercholesterolemic rabbits.** Atherosclerosis, v. 190, p. 135-142, 2007.
- Shi, J., Yu, J., Pohorly, J. E., Kakuda, Y. **Polyphenolics in grape seeds – biochemistry and functionality.** Journal of Medicinal Food, V. 6(4), p. 291-299, 2003.
- Shrilhande, A. J. **Wine by-products with health benefits.** Food Research International, v. 33, p. 469-474, 2000.
- Shukiyy-Hale, B., Carey, A., Simon, L., Mark. D. A., Joseph, J. A. **Effects of Concord grape juice on cognitive and motor deficits in aging.** Nutrition, v. 22, p. 295-302, 2006.

- Singleton, V. L. and Rossi, J. A. **Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents**. American Journal of Enology Viticulture, v.16, p.144-168, 1965.
- Sousa, C. M. M., Silva, H.R.; Vieira-Jr. G. M., Ayres, M. C. C., Costa, C. L. S., Araújo, D. S., Cavalcante, L. C. D., Barros, E. D. S., Araújo, P. B. M., Brandão, M. S., Chaves, M. H. **Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais**. Química Nova, vol. 30, nº2. São Paulo. Mar/Abr 2007.
- Stockham, K., Sheard, A., Paimin, R., Buddhadasa, S., Duong, S., Orbell, J. D., Murdoch, T. **Comparative studies on the antioxidant properties and polyphenolic content of wine from different growing regions and vintages, a pilot study to investigate chemical markers for climate change**. Food Chemistry, v. 140, p. 500-506, 2013.
- Sun, J., Chu, Y., Wu, X., Liu, R. H. **Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 50, p. 7449-7454, 2002.
- Terra, X., Montagut, G., Bustos, M., Llopiz, N., Ardévol, A., Bladé, C., Fernández-Larrea, J., Pujadas, G., Salvadó, J., Arola, L., Blay, M. **Grape-seed procyanidins prevent low-grade inflammation by modulating cytokine expression in rats fed a high-fat diet**. Journal of Nutricional Biochemistry, v. 20, p. 210-218, 2009.
- Tiveron, A. P. **Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil**. 2010. 103p. Dissertação (Mestre em Ciências) – Universidade de São Paulo.
- Tsang, C., Higgins, S., Duthie, G. G., Duthie, S. J., Howie, M., Mullen, W., Lean, M. E. J., Croizer, A. **The influence of moderate red wine consumption on antioxidant status and indices of oxidative stress with CHD in healthy volunteers**. British Journal of Nutrition, v. 93, p. 233-240, 2005.
- UVIBRA – União Brasileira de Vitivinicultura, acesso em 14/11/2013 (http://www.uvibra.com.br/dados_estatisticos.htm).
- Valdameri, G. **Avaliação da morte celular induzida por flavonas em células HepG2 e identificação de novos inibidores de ABCG2**. 2012. 154p. Dissertação (Doutorado em Ciências-Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná.
- Weng, C., Yen, G. **Chemopreventive effects of dietary phytochemicals against câncer invasion and metastasis: phenolic acids, monophenol, polyphenol, and their derivatives**. Cancer Treatment Reviews, v. 38, p. 76-87, 2012.
- Wolfe, K. L., Liu, R. H. **Cellular Antioxidant Activity (CAA) Assay for Assessing Antioxidants, Foods, and Dietary Supplements**. J. Agric. Food Chem., Vol. 55, No. 22, 2007.
- Xia, E., Deng, G., Guo, Y., Li, H. **Biological activities of polyphenols from grapes**. International Journal of Molecular Sciences, v. 11, p. 622-646, 2010.

- Yi, W., Akoh, C. C., Fischer, J., Krewer, G. **Effects of phenolic compounds in blueberries and muscadine grapes on HepG2 cell viability and apoptosis.** Food Research International, v. 39, p. 628-638, 2006.
- Yildirim, H. K., Akçay, Y. D., Güvenç, U., Altindisli, A., Sözmen, E. **Antioxidant activities of organic grape, pomace, juice, must, wine and their correlation with phenolic content.** International Journal of Food Science and Technology, v. 40, p. 133-142, 2005.
- Yilmaz, Y., Toledo, R. T. **Healthy aspects of functional grape seed constituents.** Trends in Food Science & Technology, v. 15, p. 422-433, 2004.
- You, B. R. & Park, W. H. **The effects of antimycin A on endothelial cells in cell death, reactive oxygen species and GSH levels.** Toxicology in Vitro, v. 24, p. 1111-1118, 2010.
- Zhang, D., Xie, L., Wei, Y., Liu, Y., Jia, G., Zhou, F., Ji, B., **Development of a cell-based antioxidant activity assay using dietary fatty acid as oxidative stressor.** Food Chemistry, v. 141, p. 347-356, 2013.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W. **The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals.** Food Chemistry, v. 64, p. 555-559, 1999.
- Zulueta, A.; Esteve, M.J.; Frígola, A. **ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products.** Food Chem., v.114, p. 310-316, 2009.