

Isabel Cristina da Silva Haas

**RESÍDUO OBTIDO DO PROCESSAMENTO DE SUCOS DE
UVA (*VITIS LABRUSCA* L.): COMPOSIÇÃO FENÓLICA,
BIOACESSIBILIDADE *IN VITRO* E POTENCIAL BIOLÓGICO
EM CÉLULAS TUMORAIS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do grau de doutor em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Marilde T. Bordignon Luiz.

Florianópolis
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

Haas, Isabel Cristina da Silva
RESÍDUO OBTIDO DO PROCESSAMENTO DE SUCOS DE UVA
(VITIS LABRUSCA L.): COMPOSIÇÃO FENÓLICA,
BIOACESSIBILIDADE IN VITRO E POTENCIAL BIOLÓGICO EM
CÉLULAS TUMORAIS / Isabel Cristina da Silva Haas ;
orientadora, Marilde T. Bordignon-Luiz, 2019.
188 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de
Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Florianópolis,
2019.

Inclui referências.

1. Ciência dos Alimentos. 2. Resíduo de uva. 3.
Compostos fenólicos. 4. Bioacessibilidade. 5.
Células tumorais. I. Bordignon-Luiz, Marilde T. .
II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.
III. Título.

**RESÍDUO OBTIDO DO PROCESSAMENTO DE SUCOS DE
UVA (*VITIS LABRUSCA* L.): COMPOSIÇÃO FENÓLICA,
BIOACESSIBILIDADE *IN VITRO* E POTENCIAL BIOLÓGICO
EM CÉLULAS TUMORAIS**

Por

Isabel Cristina da Silva Haas

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de
“Doutorem Ciência dos Alimentos”, e aprovada em sua forma final pelo
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

Florianópolis, 20 de fevereiro de 2019.

Prof.^aDr.^aAna Carolina de Oliveira Costa
Coordenador

Banca Examinadora:

Prof.^aDr.^aMarilde Terezinha Bordignon Luiz,
Orientadora- Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^aDr.^a Márcia Inês Goettert
Membro- Universidade do Vale do Taquari

Prof.^aDr.^a Eliana Fortes Gris
Membro- Universidade de Brasília

Prof.^aDr.^a Renata Dias de Mello Castanho Amboni
Membro- Universidade Federal de Santa Catarina

*Dedico a meus pais, Hardi e Sonia
pelo amor, incentivo e dedicação.*

AGRADECIMENTOS

A Deus.

À família, especialmente aos meus pais, Hardi e Sonia, pelo apoio, motivação e incentivo constante.

À Marina pelo apoio e incentivo, agradeço pela motivação de todos os dias, obrigada por sempre estar ao meu lado quando mais precisei.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Marilde T. Bordignon Luiz, pela oportunidade e confiança depositada para realização deste trabalho, pela paciência e portodo o aprendizado compartilhado durante todos esses anos.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação pelos ensinamentos.

À Prof^a. Dr^a Isabela Maia Toaldo pelos ensinamentos, amizade e apoio constante.

À Prof^a. Márcia Inês Goettert da Universidade do Vale do Taquari pela oportunidade de realizar os experimentos com cultura de células em seu laboratório, por toda sua disponibilidade em me auxiliar com o planejamento dos experimentos e por todos os ensinamentos compartilhados.

Aos colegas do laboratório de cultura de células da Universidade do Vale do Taquari: Sheila, Juliana, Tamara, Diorge e Monica por todos os ensinamentos e momentos compartilhados, muito obrigada por me receberem e disponibilizarem seu tempo para me ajudar.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Bioquímica de Alimentos: Saionara, Carol, Trilícia e Maiara por todo o aprendizado e momentos compartilhados.

Aos demais amigos, colegas e funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Aos membros da banca pelo aceite do convite e por suas contribuições.

À vinícola Poggere pela parceria e pela doação das amostras deste estudo.

A CAPES pelo auxílio financeiro concedido durante a realização deste trabalho.

RESUMO

A uva e seus derivados são fontes importantes de minerais e polifenóis com propriedades bioativas. A principal razão para o interesse em estudar os polifenóis são suas propriedades antioxidantes e seu papel postulado na prevenção de doenças associadas ao estresse oxidativo, como câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas. Durante a produção do suco de uva ocorre a geração de resíduos e a caracterização química deste material torna-se imprescindível para sua valorização e utilização tecnológica, além de contribuir para a sustentabilidade do setor produtivo. O resíduo de uva investigado neste estudo foi obtido da etapa de clarificação do suco de uva, onde ocorre a remoção dos sólidos que estavam suspensos (4 a 8%) em uma centrifuga decanter. Estudos que avaliem o perfil fenólico, elementar, bioacessibilidade dos fitoquímicos e propriedades bioativas do resíduo de uva obtido da centrifugação do suco são escassos, o que dificulta sua valorização e consequente aplicação industrial. O objetivo deste estudo foi caracterizar o resíduo obtido do processamento do suco de uva da variedade Bordô e Isabel (*Vitis labrusca* L.) quanto ao perfil fenólico, bioacessibilidade dos fenólicos e minerais após simulação gastrointestinal *in vitro*, e avaliar a atividade antiproliferativa *in vitro*. A análise de compostos fenólicos foi realizada utilizando espectrofotômetro UV-Vis e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD). A composição mineral foi avaliada por espectrometria de emissão óptica de plasma indutivamente acoplado (ICP OES). A atividade antiproliferativa *in vitro* do resíduo de uva e das frações bioacessíveis foram avaliadas em células saudáveis (Raw 264.7 e Mn01) e cancerígenas (Caco-2, ACP02, ACP03, HepG2) utilizando o método MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]. A caracterização do perfil fenólico do resíduo de uva foi realizada após a otimização do método de extração, um método simples e rápido foi otimizado para extração de antocianinas. Os parâmetros de extração utilizados foram: relação sólido:líquido de 1:10 (p/v), tempo de extração de 5 min e concentração de solvente metanol:água de 85:15 v/v. O resíduo de uva Bordô e Isabel apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) para todos os compostos fenólicos avaliados. As análises cromatográficas revelaram a presença de antocianinas mono e diglicosiladas em ambos os resíduos de uva. A catequina, epicatequina, ácido ferúlico, ácido caféico e *trans*-resveratrol são potentes antioxidantes e foram encontrados em altas concentrações nos resíduos de uva. A bioacessibilidade dos polifenóis e minerais foi avaliada após a digestão *in vitro* do resíduo de uva (fase oral, gástrica e

intestinal). Após a simulação da digestão as frações bioacessíveis foram analisadas quanto a bioacessibilidade dos compostos fenólicos e minerais. Durante a digestão *in vitro*, mudanças importantes foram observadas nas concentrações de polifenóis e minerais após a passagem pelas fases gástrica e entérica. O *trans*-resveratrol, catequina e epicatequina apresentaram altos índices de bioacessibilidade. A concentração de polifenóis e minerais foi reduzida significativamente ($p < 0,05$) ao final da fase intestinal. Independentemente da variedade da uva, os constituintes dos resíduos apresentaram maior atividade antioxidante na fase gástrica, o que foi relacionada à alta concentração de polifenóis nesta etapa. Os elementos Ca, Mg, Cu, Fe, Sr, Mn, Zn, Al, Ni e Pb não foram detectados na última fase de digestão, sendo pouco bioacessíveis. O resíduo de uva Bordô e Isabel inibiram a proliferação de células de adenocarcinoma do cólon, e a fração bioacessível destes resíduos aumentou a viabilidade celular de macrófagos murinos (Raw 264.7), linhagem que apresenta importantes funções de regulação imunológica. A caracterização fenólica e a bioacessibilidade *in vitro* dos compostos fenólicos e minerais, bem como estudos com cultura de células, visam a valorização deste resíduo da vitivinicultura brasileira sugerindo a sua aplicação no desenvolvimento de produtos com propriedades funcionais e nutraceuticas.

Palavras-Chave: Resíduo de uva. Polifenóis. Minerais. Bioacessibilidade. Atividade antiproliferativa.

ABSTRACT

The grape and grape derivatives are important sources of minerals and polyphenols with bioactive properties. The main reason for the interest in polyphenols is their antioxidant properties and their postulated role in the prevention of diseases associated with oxidative stress, such as cancer, cardiovascular and neurodegenerative diseases. During the production of grape juice, the generation of residues occurs and the chemical characterization of this material becomes essential for its valorization and technological use, in addition to contributing to the sustainability of the productive sector. The grape residue investigated in this study is obtained from the step of clarification of grape juice, where it occurs to the removal of suspended solids (4 to 8%), this process is carried out in a decanter centrifuge. Studies that evaluate the phenolic profile, elemental, bioaccessibility of the phytochemicals and bioactive properties of grape residue obtained from juice centrifugation are scarce, which makes it difficult to valorization and consequently to be applied industrially. The objective of this study was to characterize the phenolic profile of the residue obtained from processing of the grape varieties Bordo and Isabel (*V. labrusca* L.) and to evaluate the bioaccessibility of phenolics and minerals after gastrointestinal simulation *in vitro* and antiproliferative activity *in vitro*. The analysis of individual phenolic compounds was performed using UV-Vis spectrophotometer and high performance liquid chromatography (HPLC-DAD). The mineral composition was evaluated by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES). The *in vitro* antiproliferative activity of grape residue and bioaccessible fractions were evaluated in healthy (Raw 264.7 and Mn01) and carcinogenic cells (Caco-2, ACP02, ACP03, HepG2) using the MTT method [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]. The characterization of the phenolic profile of the grape residue was performed after the optimization of the extraction method, the results presented a simple and fast extraction method was optimized for extraction of anthocyanins. The extraction parameters used were: solvent:solid ratio of 1:10 (w/v), extraction time of 5 min and concentration of solvent methanol:water of 85:15 v/v. The residue of grape juice Bordo and Isabel presented significant difference ($p < 0.05$) for all phenolic compounds evaluated. The chromatographic analyzes revealed the presence of mono and diglucosides anthocyanins in both grape residues. The anthocyanin identified at higher concentrations in the residue of grape Bordo was the malvidin-3,5-diglucoside. The catechin, epicatechin, ferulic acid, caffeic acid and

trans-resveratrol are potent antioxidants and were found at high concentrations in grape residues. The bioaccessibility of the polyphenols and minerals were evaluated after the *in vitro* digestion of the grape residue. *In vitro* gastrointestinal digestion consists of three steps, the phases oral, gastric and intestinal. After digestion simulation the bioaccessible fractions were analyzed for bioaccessibility of phenolic and mineral compounds. During *in vitro* digestion, important changes were observed in the concentrations of polyphenols and minerals after passage through the gastric and enteric phases. The *trans*-resveratrol, catechin and epicatechin showed high indexes of bioaccessibility. The concentration of polyphenols and minerals was significantly reduced ($p < 0.05$) at the end of the intestinal phase. Regardless of the grape variety, the constituents of the residues presented greater antioxidant capacity in the gastric phase, which was related to the high concentration of polyphenols in this step. The elements Ca, Mg, Cu, Fe, Sr, Mn, Zn, Al, Ni and Pb were not detected at the last phase of digestion, being poorly bioaccessible. The residue of grape Bordo and Isabel inhibited the proliferation of colon adenocarcinoma cells, and the bioaccessible fraction of these residues increased the cell viability of murine macrophages (Raw 264.7), a lineage that has important immune regulation functions. The phenolic characterization and *in vitro* bioaccessibility of the phenolic and mineral compounds, as well as studies with cell culture, aim at the valorization of this residue of Brazilian winemaking, suggesting its application in the development of products with functional and nutraceutical properties.

Keywords: Grape residue. Polyphenols. Minerals. Bioaccessibility. Antiproliferative activity.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1.** Uva Bordô (A) e Isabel (B) utilizada na elaboração do suco de uva.....35
- Figura 2.** Etapas do processamento do suco de uva e os principais resíduos gerados. A) Recebimento da matéria-prima; B) Desengace; C) Separação dos sólidos do suco em esgotador; D) Prensagem e remoção do bagaço (cascas e sementes) e etapa de centrifugação do suco de uva. E) Centrífuga decanter; F) resíduo obtido da centrifugação do suco (sólidos suspensos).....38
- Figura 3.** Principais flavonoides da uva.....44
- Figura 4.** Principais ácidos fenólicos e estilbenos.....49
- Figura 5.** Células carcinogênicas em baixa (A) e alta densidade (B) para as linhagens Raw 264.7 (1), Caco-2 (2) e HepG2 (3).....70
- Figura 6.** Células gástricas da linhagem Mn01 (A), ACP02 (B) e ACP03 (C).....71

CAPÍTULO 2

- Figura 1.** Extração dos compostos fenólicos do resíduo de uva utilizando diferentes métodos de extração: agitador de placa (120 min), ultrassom (30 min) e agitador orbital (5 min). (A) Flavanóis, ácidos hidroxicinâmicos, flavanóis e estilbeno; (B) ácidos hidroxibenzóicos. Condições fixas: massa de amostra (0,25 g), proporção solvente:água 80:20 (v/v) e volume (5 mL). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (n=3). Grupos homogêneos de acordo com o teste de comparação múltipla de Tukey, com nível de confiança de 95%. Letras diferentes para o mesmo composto indicam diferença significativa ($p < 0,05$).....89

Figura 2. Extração dos compostos fenólicos do resíduo de uva utilizando soluções hidroalcoólicas de metanol, etanol e acetona como solventes de extração. (A) Flavanóis, ácidos hidroxicinâmicos, flavonóis e estilbeno. (B) ácidos hidroxibenzóicos. (C) antocianinas. Condições fixas: agitador orbital (5 min), massa de amostra (0,25 g), proporção solvente:água 80:20 (v/v) e volume (5 mL). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (n=3). Grupos homogêneos de acordo com o teste de comparação múltipla de Tukey, com nível de confiança de 95%. Letras diferentes para o mesmo composto indicam diferença significativa ($p < 0,05$).....90

Figura 3. Gráficos de superfície de resposta para avaliar o efeito da concentração de solvente, tempo e razão sólido-líquido na extração de antocianinas individuais (soma das áreas de pico) (A) Concentração de solvente (%) vs Tempo (min). (B) Relação sólido-líquido vs Tempo (min). (C) Relação sólido-líquido (m/v) vs concentração de solvente (%).....95

Figura 4. Cromatogramas de antocianinas dos resíduos de uva (A) Bordô; (B) Isabel. 1: cianidina-3,5-diglicosídeo; 2: delphinidina-3-O-glicosídeo; 3: malvidina-3,5-diglicosídeo; 4: cianidina-3-O-glicosídeo; 5: peonidina-3-O-glicosídeo; 6: malvidina-3-O-glicosídeo. TR (A/B) = 9.639/nd; TR (A/B) = 10.908/11.053; TR (A/B) = 12.128/12.272; TR (A/B) = 12.816/12.959; TR (A/B) = 15.842/15.941; TR = (A/B) = 16.619/16.708. TR = tempo de retenção.... 101

CAPÍTULO 3

Figura 1. Soma dos compostos fenólicos individuais (mg/kg) do resíduo de uva após digestão gastrointestinal *in vitro*. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão. Para cada variedade, letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$). CSB: Controle do resíduo de uva Bordô, OPB: fase oral Bordô, GPB: fase gástrica Bordô, IPB: fase intestinal Bordô, NDFB: fração não digerível Bordô, CSI: controle do resíduo de uva Isabel, OPI: fase oral Isabel, GPI: fase gástrica Isabel, IPI: fase intestinal Isabel, NDFI: fração não digerível Isabel.).....123

Figura 2. Cromatogramas do perfil de antocianinas do resíduo de uva (Bordô, *V. labrusca* L.) (A) Fase Oral, (B) Fase Gástrica, (C) Fase Intestinal. Picos: 1: cianidina-3,5-diglicosídeo; 2: delfinidina-3-*O*-glicosídeo; 3: malvidina-3,5-diglicosídeo; 4: cianidina-3-*O*-glicosídeo; 5: peonidina-3-*O*-glicosídeo; 6: malvidina-3-*O*-glicosídeo. TR (A/B/C) = nd/9.3/9.3; TR (A/B/C) = 10.0/10.6/10.6; TR (A/B/C) = 10.8/11.8/11.8; TR (A/B/C) = nd/12.6/12.5; TR (A/B/C) = 14.2/15.5/15.5; TR (A/B/C) = 15.0/16.3/16.3.....133

Figura 3. Análise de componentes principais dos compostos fenólicos individuais e capacidade antioxidante durante a digestão *in vitro* dos resíduos de uva Isabel (A) e Bordô (B). OPI: fase oral Isabel; GPI: fase gástrica Isabel; IPI: fase intestinal Isabel; OPB: fase oral Bordô; GPB: fase gástrica Bordô; IPI: fase intestinal Bordô; GAE, gálico; PROT, protocateico; VAN, vanílico; SYR, siríngico, CAF, cafeico; CAFT, caftárico; CUM, *para*-cumárico; FER, ferúlico; CAT, catequina; EPI, epicatequina; CYAN-3-*O*, cianidina-3-*O*-glicosídeo; CYAN-3,5, cianidina-3,5-diglicosídeo; MALV-3,5, malvidina-3,5-diglicosídeo; MALV-3-*O*, malvidina-3-*O*-glicosídeo; PEON-3-*O*, peonidina-3-*O*-glicosídeo; DELF-3-*O*, delfinidina-3-*O*-glicosídeo; RESV, *trans*-resveratrol; ABTS e DPPH, capacidade antioxidante utilizando ensaios de sequestro de radicais livres.....135

CAPÍTULO 4

Figura 1. Viabilidade celular de linhagens gástricas tratadas com os resíduos de uvas e as frações bioacessíveis. (A) ACP03, (B) ACP02, (C) Mn01. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão. Para o controle (CN) foi atribuído um valor de 100%. *Representa diferença significativa ($p < 0,05$) no tratamento com as amostras em relação ao controle. CN, controle negativo; DMSO, dimetilsulfóxido; EB, resíduo de uva bordô; FGB, fase gástrica Bordô; FIB, fase intestinal Bordô; EI, resíduo de uva Isabel; FGI, fase gástrica Isabel; FII, fase intestinal Isabel.....156

Figura 2. Viabilidade celular de linhagens de carcinoma do cólon humano (Caco-2) (A) e carcinoma hepatocelular (HepG2) (B) tratados com os resíduos de uvas e as frações bioacessíveis. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão. Para o controle (CN) foi atribuído um valor de 100%. *Representa diferença significativa ($p < 0,05$) no tratamento com as amostras em relação ao controle. CN, controle negativo; DMSO, dimetilsulfóxido; EB, resíduo de uva bordô; FGB, fase gástrica Bordô; FIB, fase intestinal Bordô; EI, resíduo de uva Isabel; FGI, fase gástrica Isabel; FII, fase intestinal Isabel.....158

Figura 3. Viabilidade da célula Raw 264.7 após o tratamento com o resíduo de uva e a fração bioacessível na concentração de 200 e 500 $\mu\text{g/ml}$. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão. Para o controle (CN) foi atribuído um valor de 100%. *Representa diferença significativa ($p < 0,05$) no tratamento com as amostras em relação ao controle. CN, controle negativo; DMSO, dimetilsulfóxido; EB, resíduo de uva Bordô; FGB, fase gástrica Bordô; FIB, fase intestinal Bordô; EI, resíduo de uva Isabel; FGI, fase gástrica Isabel; FII, fase intestinal Isabel.....159

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Matriz codificada de planejamento fatorial completo de três níveis contendo três pontos centrais.....82

Tabela 2. Análise de variância da superfície de resposta da extração de antocianinas individuais do resíduo de uva.....92

Tabela 3. Composição fenólica do resíduo de uva da variedade Bordô e Isabel.....100

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Composição fenólica individual (mg/kg) e capacidade antioxidante do resíduo de uva Bordô e Isabel após simulação gastrointestinal.....125

Tabela 2. Comportamento dos compostos fenólicos após digestão gastrointestinal do resíduo de uva e estabilidade de padrões comerciais relatados na literatura.....128

Tabela 3. Composição elementar de resíduos de uva após simulação gastrointestinal.....138

CAPÍTULO 4

Tabela 1. Avaliação do potencial citotóxico da catequina, quercetina e miricetina em células Raw 264.7, HepG2 e Caco-2.....161

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DAD	Detector de arranjo de diodo (do inglês: diode array detector)
DPPH	(2,2-difenil-1-picrilhidrazila)
FRAP	Fe ³⁺ -2,4,6-tripiridil-s-triazina
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês: high performance liquid chromatography)
ICP OES	Espectrometria de Emissão Óptica Plasma Acoplada Indutivamente (do inglês: Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry)
LOQ	Limite de quantificação
LD	Limite de detecção
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
ND	Não detectado
UV-Vis	Ultravioleta-visível

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	25
CAPÍTULO 1	
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
1.1 Panorama da viticultura no Brasil.....	31
1.2 Características das variedades de uva Bordô e Isabel (<i>Vitis labrusca</i> L).....	33
1.3 Processamento do suco de uva.....	35
1.4 Subprodutos do processamento de uvas.....	39
1.5 Composição química da uva.....	42
1.5.1 Composição fenólica.....	42
1.5.2 Capacidade antioxidante.....	51
1.6 Propriedades bioativas das substâncias fenólicas da uva.....	52
1.7 Minerais.....	55
1.8 Modelo de digestão <i>in vitro</i>.....	57
1.9 Potencial anti-proliferativo de compostos bioativos presentes em alimentos de origem.....	61
1.9.1 Culturas de células.....	67
1.9.1.1 Atividade antiproliferativa <i>in vitro</i>	71
CAPÍTULO 2	
OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DO PERFIL FENÓLICO E EXTRATOS BIOATIVOS DO RESÍDUO DE UVA OBTIDO DO PROCESSAMENTO DO SUCO	
RESUMO.....	75
ABSTRACT.....	76

1. INTRODUÇÃO.....	78
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	79
2.1. Reagentes.....	79
2.2 Amostras.....	79
2.3 Extração dos compostos fenólicos.....	80
2.4 Delineamento experimental.....	80
2.5 Determinação dos compostos fenólicos e atividade antioxidante..	82
2.6 Determinação de compostos fenólicos individuais por HPLC.....	83
2.7 Análise estatística.....	84
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	84
3.1 Efeito dos métodos de extração na composição fenólica do resíduo de uva.....	84
3.2 Otimização da extração de polifenóis individuais.....	91
3.3 Perfil bioativo e atividade antioxidante do resíduo de uva.....	95
4. CONCLUSÃO.....	102
REFERÊNCIAS.....	103

CAPITULO 3

PERFIL FENÓLICO, MACRO E MICROELEMENTOS EM FRAÇÕES BIOACESSÍVEIS DO RESÍDUO DE UVA USANDO SIMULAÇÃO GASTRINTESTINAL *IN VITRO*

RESUMO.....111

ABSTRACT.....112

1. INTRODUÇÃO.....113

2. MATERIAL E MÉTODOS.....115

2.1 Reagentes.....	115
2.2 Amostras.....	116
2.3 Simulação gastrointestinal <i>in vitro</i>	117
2.4 Bioacessibilidade dos compostos fenólicos e capacidade antioxidante das frações bioacessíveis.....	118
2.5 Determinação dos compostos fenólicos individuais por HPLC.....	119
2.6 Determinação multielementar por ICP OES	121
2.7 Análise estatística.....	121
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	121
3.1 Efeito da digestão <i>in vitro</i> sobre a composição fenólica e capacidade antioxidante do resíduo de uva	121
3.2 Alterações nos níveis de compostos fenólicos individuais durante a digestão <i>in vitro</i>	127
3.3 Análise de componentes principais.....	134
3.4 Efeito da digestão <i>in vitro</i> na composição elementar.....	136
4. CONCLUSÃO.....	139
REFERÊNCIAS.....	140

CAPITULO 4

ATIVIDADE CITOTÓXICA DO RESÍDUO DE UVA (*VITIS LABRUSCA* L.) OBTIDO DO PROCESSAMENTO DO SUCO E DE SUAS FRAÇÕES BIOACESSÍVEIS APÓS SIMULAÇÃO GASTROINTESTINAL *IN VITRO*

RESUMO.....	147
1. INTRODUÇÃO.....	148

2. MATERIAL E MÉTODOS.....	145
2.1 Reagentes químicos.....	145
2.2 Elaboração do suco de uva e obtenção do resíduo de uva.....	151
2.3 Digestão <i>in vitro</i>	151
2.4 Linhagem celular.....	152
2.5 Atividade citotóxica.....	153
2.6 Análise estatística.....	154
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	154
3.1 Atividade antiproliferativa <i>in vitro</i>	154
3.2 Efeito dos compostos fenólicos na viabilidade celular.....	160
4. CONCLUSÃO.....	163
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	165
REFERÊNCIAS.....	167

INTRODUÇÃO

A geração de resíduos provenientes da vitivinicultura vem crescendo nos últimos anos, fato que está relacionado principalmente com o aumento da produção de vinhos e sucos (MELLO, 2016). A produção de uvas no Brasil foi de 984.244 toneladas em 2016, sendo a região Sul do Brasil a maior produtora de uvas do país, com importante destaque na vitivinicultura nacional (MELLO, 2017). No Brasil, para elaboração do suco de uva são utilizadas as variedades americanas *Vitis labrusca* L., sendo amplamente cultivadas na região sul e representando mais de 80% das uvas processadas. Entre as variedades mais cultivadas destacam-se a Bordô e Isabel, que correspondem a cerca de 50% da produção nacional de uvas (MELLO, 2011).

Durante a elaboração do suco de uva, na etapa de maceração, as substâncias fenólicas são transferidas para o mosto, no entanto, grande parte dessas substâncias ainda permanecem nos tecidos vegetais. Nas etapas de desengace, prensagem e centrifugação do suco de uva são gerados três resíduos sólidos: engaço, bagaço e o resíduo da centrifugação. O resíduo investigado neste estudo é obtido da etapa de centrifugação do suco de uva, nesta etapa ocorre a remoção dos sólidos que estavam suspensos (4 a 8%) em equipamento denominado de centrífuga decanter. A separação destes sólidos contribui para a qualidade do suco de uva, reduzindo a turbidez, atuando como uma etapa de clarificação (HAAS et al., 2016).

Os subprodutos da indústria de suco de uva são importantes fontes de substâncias fenólicas e minerais. Os flavonoides, ácidos fenólicos e estilbenos são responsáveis por relevantes atividades

biológicas (JACKSON, 2008). Os minerais participam de importantes funções biológicas e são encontrados na planta como macronutrientes e micronutrientes. Os minerais Na, K, Mg, Ca, Mn e Fe são encontrados em maior concentração na uva e seus derivados (PANCERI et al., 2013; TOALDO et al., 2013; HAAS et al., 2016). A presença de metais deve-se principalmente às práticas agrícolas aplicadas nos vinhedos, como o uso de fungicidas e produtos fitossanitários (SÔNEGO et al., 2005).

A prevenção de várias patologias crônicas, incluindo doenças cardiovasculares, diabetes e doenças neurodegenerativas, bem como alguns tipos de câncer é amplamente associada a alimentos ricos em polifenóis (VAUZOUR et al., 2010; TOALDO et al., 2015). Diversos estudos indicam o potencial anticancerígeno das substâncias fenólicas, principalmente na sua capacidade de inibir a proliferação das células cancerígenas (LEE et al., 2006; RAMOS et al., 2011; VU et al., 2012). Os fenólicos também atuam na redução do dano oxidativo e podem ter efeitos neuroprotetores (KICH et al., 2016). Estudos epidemiológicos investigaram explicitamente a digestão, a absorção intestinal e o metabolismo dos polifenóis, o que pode elucidar diferentes perspectivas sobre sua bioatividade (CILLA, et al., 2009).

A capacidade das substâncias fenólicas em exercer ações benéficas está estritamente relacionada à sua bioacessibilidade e consequente biodisponibilidade. Avaliar as possíveis transformações químicas que as substâncias fenólicas podem sofrer durante a digestão é importante para entender seus efeitos biológicos (MANACH, et al., 2004). Nesse contexto, estudos relatam que certas substâncias fenólicas são altamente disponíveis, enquanto a maioria dos fenóis é pouco ou não

é absorvida no intestino delgado (FERRARS et al., 2014; TENORE et al., 2013).

O interesse em estudos que visem a quantificação de substâncias fenólicas, minerais ou outros nutrientes em matrizes vegetais tem aumentado, pois fornecem informações sobre a qualidade nutricional, principalmente sobre a composição química. Além disso, estudos sobre a disponibilidade, absorção e comportamento gastrointestinal dos nutrientes e fitoquímicos fornecem informações importantes sobre as propriedades funcionais ou bioativas. A simulação gastrointestinal *in vitro* pode ser útil para investigar o efeito da digestão na bioacessibilidade de polifenóis e minerais, a fim de obter dados essenciais para apoiar as alegações da relevância biológica desses componentes alimentares no contexto da nutrição e saúde humana. Portanto, o estudo com resíduos ricos em substâncias fenólicas torna-se de interesse para sua utilização na indústria de alimentos e farmacêutica (CHOI, LEE, 2009; JARA-PALACIOS et al., 2015).

O objetivo deste estudo foi caracterizar o resíduo do processamento do suco de uva da variedade Bordô e Isabel (*Vitis labrusca* L.) quanto ao perfil fenólico, bioacessibilidade dos fenólicos e minerais após simulação gastrointestinal *in vitro*, e avaliar a atividade antiproliferativa *in vitro*. É de extrema relevância estudos que visem o aproveitamento e valorização deste resíduo, pois a sua utilização como matéria prima pode significar um ganho econômico significativo para as vinícolas e a redução dos problemas ambientais associados à sua acumulação no meio ambiente, além de proporcionar às indústrias um produto de alto valor agregado.

A presente tese está estruturada em capítulos, sendo o primeiro referente à revisão bibliográfica e os demais referentes aos resultados da pesquisa experimental, os quais foram elaborados no formato de artigos científicos.

O capítulo 1 consta com a revisão bibliográfica que descreve a viticultura e produção de suco de uva no Brasil, o processamento do suco de uva, subprodutos do processamento de uvas, a composição química da uva, propriedades bioativas das substâncias fenólicas da uva, minerais, modelo de digestão *in vitro* e potencial anti-proliferativo de compostos químicos presentes em alimentos de origem vegetal.

O capítulo 2 apresenta a otimização do processo de extração de antocianinas, visando determinar as melhores condições de extração, e a caracterização pela primeira vez o perfil fenólico do resíduo obtido da centrifugação do suco de uva.

O capítulo 3 descreve o efeito da digestão *in vitro* do resíduo obtido da centrifugação do suco na bioacessibilidade dos polifenóis individuais e dos minerais.

O capítulo 4 apresenta o efeito antiproliferativo do resíduo de uva antes e após simulação gastrointestinal *in vitro* sob linhagens celulares saudáveis e carcinogênicas, bem como o efeito das substâncias fenólicas (catequina, miricitina e quercetina) na proliferação celular.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Panorama da viticultura no Brasil

A viticultura brasileira é baseada principalmente na produção de variedades de uvas americanas e híbridas, sendo utilizadas na elaboração de vinhos de mesa, suco de uva e outros derivados. O Rio Grande do Sul é o maior produtor nacional de uvas americanas, o cultivo desta variedade corresponde a maior parte da produção da região. A produção de uvas está localizada nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste, sendo uma atividade consolidada e com grande importância socioeconômica. Em virtude da diversidade ambiental brasileira, existem regiões com viticultura característica de regiões temperadas e regiões tropicais. A viticultura em regiões temperadas ocorre em período de repouso hibernar definido, onde a videira é cultivada com dois ciclos vegetativos anuais. Já na região tropical a videira é cultivada com dois e meio a três ciclos vegetativos por ano, estes ciclos tem início na brotação da planta até o amadurecimento do fruto (MELLO et al., 2003; MELLO et al., 2016). Aproximadamente 90% da produção de uvas de clima temperado são destinados ao processamento e fabricação de sucos, vinhos, e outros derivados (PROTAS; CAMARGO, 2011; IBRAVIN, 2013).

Embora a produção de suco de uva ocorra em diversas regiões brasileiras, a maior produção está localizada no estado do Rio Grande do Sul, onde foram elaborados 52.233.155 litros de suco de uva integral e 178.306.565 litros de suco de uva concentrado no ano de 2015 (MELLO, 2016). O aumento da produtividade no setor vitivinícola só foi atingido a partir da década de 70, pois as vinícolas começaram seu

processo de modernização, motivadas pela melhoria da qualidade de seus produtos. Após a modernização do sistema produtivo, o suco de uva conseguiu se destacar pela sua qualidade e padronização, atingindo a qualidade desejada por mercados internacionais. Os investimentos na implantação de novas estruturas de processamento e concentração de suco de uva evidenciam o potencial de expansão deste mercado e a tendência de diversificação dentro da cadeia vitivinícola (MELLO et al., 2003)

No Brasil foram produzidas 1.499.353 toneladas de uvas em 2015, o que representa um aumento de 4,41% na produção em relação ao ano de 2014. Em 2016 a produção de uvas foi de 987.059 toneladas, representando uma produção menor (34,08%) que a observada em 2015. A produção de uvas foi menor devidoas condições climáticas adversas, como inverno ameno e primavera antecipada (MELLO, 2016; MELLO, 2017). Um panorama diferente foi observado para a produção nacional de uvas destinadas ao processamento de vinho em 2016, onde 35,02% da produção nacional foi destinada ao processamento de derivados de uva, representando 345.623 milhões de quilos, o restante da produção (65,98%) foi destinado ao consumo *in natura*. A produção do suco de uva integral e suco de uva concentrado em 2016 foi reduzida em 28 e 67% respectivamente em relação ao ano de 2014 (MELLO, 2017). O clima é um fator determinante na produção e qualidade da uva, o que pode resultar na redução da produção de uva como na safra de 2016. As perspectivas para os próximos anos é o aumento da produção de uvas e seus derivados, motivados pela expansão do mercado interno e externo (MELLO, 2017).

1.2 Características das variedades de uva Bordô e Isabel (*Vitis labrusca* L.)

O setor vitivinícola brasileiro é caracterizado pela diversidade de cultivos, sendo cultivadas uvas finas (*Vitis vinifera*), americanas (*Vitis labrusca*) e híbridas, tanto para elaboração de vinhos finos, vinhos de mesa e sucos, quanto para o consumo *in natura*. A região da Serra Gaúcha no Rio Grande do Sul é a maior produtora nacional de uvas americanas (MELLO, 2017). As uvas *Vitislabrusca* L. são denominadas de uvas rústicas ou uvas de mesa, apresentam elevada produtividade e resistência às doenças fúngicas, além de características de sabor e aroma que são determinantes na preferência de muitos consumidores, seja para o consumo *in natura* ou para a produção de vinhos de mesa e sucos (MAIA, CAMARGO, 2005).

Os sucos elaborados com a variedade de uva *Vitis labrusca* L. apresentam coloração púrpura-violácea, excelente aroma e equilíbrio entre doçura e acidez (RIZZON; MANFROI; MENEGUZZO, 1998). O suco de uva é definido como uma bebida não fermentada, obtida do mosto simples, sulfitado ou concentrado, de uva sã, fresca e madura (BRASIL, 1988). A legislação brasileira classifica o suco de uva em: integral, reprocessado ou reconstituído, desidratado e concentrado. No suco de uva integral, o açúcar provém exclusivamente da uva, não é permitido a adição de sacarose. O suco de uva reprocessado ou reconstituído é aquele obtido pela diluição do mosto concentrado, e o suco concentrado é obtido da desidratação parcial com teor final mínimo de sólidos solúveis de 65 °Brix (BRASIL, 2004).

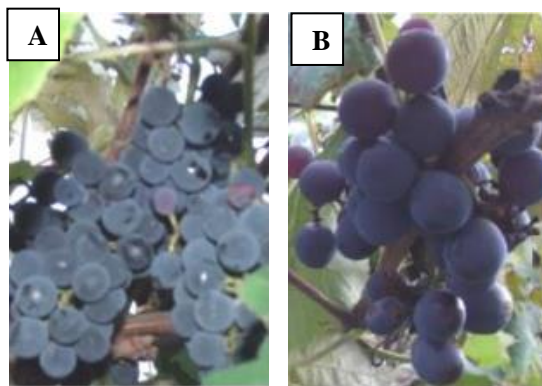
As principais variedades de uvas utilizadas para a produção do suco são a Concord, Isabel, Bordô e Niágara. A variedade Bordô (Figura

1-A) é a cultivar que apresenta a maior rusticidade quanto aos aspectos fitossanitários, tem fácil adaptação agrícola, alta produtividade e rusticidade (RIZZON; MANFROI; MENEGUZZO, 1998). Esta variedade de uva tinta tem maior importância comercial em regiões com inverno definido, apresentando dificuldade de desenvolvimento em climas tropicais. A variedade Bordô tem como características fisiológicas cachos pequenos ou médios, com bagas pretas pequenas, polpa mucilaginosa e sementes pequenas (CAMARGO, 2008). Apresenta alta concentração de pigmentos antociânicos, motivo principal de sua difusão na viticultura, origina vinho e suco com intensa coloração, muito utilizada em cortes com Isabel e Concord (RIZZON; MENEGUZZO, 2007). O suco de uva proveniente da variedade Bordô apresenta intensa coloração e sabor frutado, o que é característico de cultivares americanas (BARNABÉ, VENTURINI FILHO, BOLINI, 2007).

A variedade de uva Isabel (*Vitis labrusca* L.) (Figura 1-B) é a variedade de uva mais cultivada no Brasil, é rústica e apresenta alta fertilidade. Essa variedade está entre as mais cultivadas no sul do Brasil pois apresenta excelente adaptação, representa 50% do total de uvas produzidas, sendo responsável pelo maior volume de suco produzido no Brasil, e o principal suco de uva brasileiro destinado a exportação (CAMARGO, 2008). É uma variedade que se adaptada às condições climáticas do Sul do Brasil, sendo resistente a doenças fúngicas como o míldio. A doença do míldio é causada pelo fungo *Plasmopara viticola*, considerada uma das principais doenças da videira, seu desenvolvimento se dá em regiões com local quente e úmido e com elevadas precipitação pluviométrica nas estações da primavera e do verão (BOSO et al., 2014).

A uva Isabel apresenta cachos pequenos ou médios, baga preta e polpa mucilaginosa. É utilizada para elaboração de vinhos de mesa, vinagres, doces, geleias e sucos (CAMARGO, 2008). A variedade Isabel produz sucos com menor intensidade aromática e de cor quando comparada a variedade Bordô, sendo muito utilizada em cortes com outras variedades que apresentam coloração mais intensa para a produção do suco, como a variedade Bordô (CAMARGO; MAIA; RITSCHER, 2010).

Figura 1. Uva Bordô (A) e Isabel (B) utilizada na elaboração do suco de uva.



Fonte: Toaldo (2016)

1.3 Processamento do suco de uva

As etapas de processamento do suco de uva interferem na qualidade do suco, principalmente em relação a sua composição fenólica. As principais etapas do processamento do suco de uva da

vinícola doadora das amostras deste estudo são: a recepção da matéria prima, separação do engaço, esmague a frio, tratamento térmico, tratamento enzimático, esgotamento, prensagem, centrifugação, resfriamento, filtração a vácuo, tratamento térmico e o envase a quente (Figura 2).

Na recepção da matéria prima é avaliado o estado sanitário, peso e o teor de açúcar das uvas. A separação do engaço das bagas e esmagamento das uvas é realizada por desengaçadeira e esmagadeira mecânica. O esmague a frio das uvas contribui para a extração de substâncias fenólicas, aumentando a superfície de contato entre o mosto e a parte sólida. O mosto é submetido ao tratamento térmico que é realizado em tanques de aço inoxidável por aquecimento indireto a 85 °C utilizando termomaceras tubulares, o que contribui para extração dos compostos fenólicos (VENTURIN, 2004). A maceração e a extração à quente facilitam a extração e difusão das substâncias presentes na uva, como os fenólicos, presentes nas cascas, sementes e polpa, sendo responsáveis pelas características sensoriais do suco. O tratamento enzimático é realizado com a adição de enzimas pectinolíticas para reduzir a turbidez do suco de uva (VENTURIN, 2004; RIZZON, MENEGUZZO, 2007).

As etapas responsáveis por separar os constituintes sólidos e líquidos durante o processamento do suco de uva são o esgotamento, prensagem e centrifugação. O processo de esgotamento é realizado em equipamento cilíndrico denominado de esgotador dinâmico, que aumenta a eficiência de separação do suco e dos sólidos da uva. A parte sólida desta etapa é direcionada para a prensagem, onde ocorre à separação da fase líquida (suco) e sólida (cascas e sementes), o resíduo

sólido resultante desta etapa é denominado de bagaço. A etapa de centrifugação é realizada em equipamento centrífuga decanter, onde ocorre à remoção dos sólidos que estavam suspensos no suco de uva (4 a 8%). Segundo a legislação brasileira (BRASIL, 2004) o teor máximo de sólidos em suspensão no suco de uva deve ser 5%, o que torna necessário o processo de clarificação por meio da etapa de centrifugação. Após a retirada da fase sólida (resíduos), a fase líquida (suco) é resfriada (0 a 2 °C) para reduzir o bitartarato de potássio e consequentemente reduzir a precipitação destes sais antes do engarrafamento. A filtração a vácuo é realizada para remover os sólidos que possam estar em suspensão no suco.

O tratamento térmico é realizado novamente a 85 °C por 10 segundos, temperaturas baixas são utilizadas para obter sucos com maior teor de substâncias fenólicas, além da inativação enzimática. Para o engarrafamento o envase a quente deve ser realizado a 65-68 °C e o armazenamento de 12 a 15 °C (RIZZON; MENEGUZZO, 2007). O processo de elaboração do suco de uva gera uma grande quantidade de resíduos sólidos, essa quantidade pode ser significativamente reduzida por meio da reutilização destes resíduos que apresentam substâncias de alto valor agregado e que podem ser reutilizadas nas indústrias de alimentos, cosméticos e farmacêutica.

Figura 2. Etapas do processamento do suco de uva e os principais resíduos gerados. A) Recebimento da matéria-prima; B) Desengace; C) Separação dos sólidos do suco em esgotador; D) Prensagem e remoção do bagaço (cascas e sementes) e etapa de centrifugação do suco de uva. E) Centrífuga decanter; F) Resíduo obtido da centrifugação do suco (sólidos suspensos).



Fonte: Haas (2015)

1.4 Subprodutos do processamento de uvas

O aumento da produção vitícola contribuiu para a maior geração de subprodutos como sementes, cascas, engaço e polpa residual, e estes representam cerca de 30% do peso do fruto (GONZÁLEZ-CENTENO et al., 2012). Os principais resíduos gerados durante a elaboração de vinhos, sucos e derivados são: o engaço que é obtido na etapa de desengaço, o bagaço que é retirado na etapa de prensagem, e o resíduo da centrifugação do suco que é obtido na etapa de centrifugação do suco de uva. As uvas apresentam diferentes substâncias fenólicas distribuídas na polpa (10%), nas sementes (60-70%) e na casca (28-35%) (SHI; YU; POHORLY, 2003). A composição química dos subprodutos gerados pela indústria vitivinícola pode ser influenciada por fatores ambientais como plantio, colheita, variedade de uva e também pelo processo ao qual foi submetida (ARNOUS; MEYER, 2009). O uso de subprodutos da uva pode ser uma alternativa promissora, não apenas motivada por questões ambientais, mas também pela possibilidade de melhorar a qualidade dos alimentos e desenvolver ingredientes e produtos de alto valor agregado. Os subprodutos da uva são fontes de compostos fenólicos, com alta atividade antioxidante e antibacteriana, além de moderadas propriedades citotóxicas. É extremamente importante agregar valor a esse tipo de subproduto, a fim de incrementar seu uso na extração de biomoléculas para aplicações nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética (PEIXOTO et al., 2018).

O engaço é a parte responsável pela armação do cacho da uva que suporta o fruto, representa de 2,5% a 7,5% do peso total do cacho (NERANTZIS; TATARIDIS, 2006; GARCIA-PEREZ et al., 2010). O

engaçõ representa quase 25% do total de resíduos gerados na viticultura, rico em minerais e taninos, possui baixo teor de açúcares e ácidos orgânicos (PUJOL et al., 2013). Estudos comprovam que o engaçõ é uma fonte promissora de fitoquímicos bioativos (ANASTASIADI et al., 2012; DOMÍNGUEZ-PERLES et al., 2016). Estudo demonstra que o engaçõ de uva apresenta efeito anti-carcinogênico contra o câncér de cólon, mama e rins, e representa uma fonte rica de compostos de alto valor agregado, com alta atividade antioxidante e propriedades antimicrobianas (SAHPAZIDOU et al., 2014). A utilização do engaçõ como fonte de polifenóis de alto valor agregado é de grande interesse para as vinícolas, visando o aproveitamento deste material pela indústria de alimentos, além da proteção ambiental que o descarte inadequado ocasionaria (ANASTASIADI et al., 2012; RUIZ-MORENO et al., 2015).

O bagaçõ de uva (sementes e cascas) representa 20 a 30% do peso inicial da uva (RONDEAU et al., 2013). As sementes representam de 2 a 5% do peso da uva e constituem aproximadamente 38 a 52% dos resíduos sólidos gerados pelas indústrias vinícolas, sua composição consiste em 40% de fibras, 10 a 20% de lipídios, 10% de proteínas, fenólicos complexos, açúcares e minerais (BRENES et al., 2016; ROCKENBACH et al., 2012). As antocianinas são encontradas principalmente na casca e os flavonóis nas sementes. As antocianinas predominantes no bagaçõ de uvas *Vitis vinífera* é a malvidina-3-*O*-glicosídeo, peonidina-*O*-glicosídeo, petunidina-*O*-glicosídeo e delphinidina-*O*-glicosídeo. As cascas e sementes possuem uma importante composição bioativa, e dentre todas as substâncias fenólicas que estão presentes, as antocianinas e *trans*-resveratrol são os mais

estudados e utilizados pelas indústrias (CHIRA et al., 2008). O interesse em utilizar os corantes naturais (antocianinas) como substituto dos corantes sintéticos pode estar relacionado com suas propriedades bioativas, coloração e a solubilidade em água (BORDIGNON-LUIZ et al., 2007). Já o interesse na utilização do *trans*-resveratrol está associado com sua ação anti-inflamatória, anticancerígena e efeitos cardioprotetor, neuroprotetor e antioxidante (ANASTASIADI et al., 2010; TRELA; WATERHOUSE, 1996).

O resíduo da centrifugação do suco de uva é constituído dos sólidos que estavam suspensos no suco e que foram retirados na etapa de centrifugação, representa de 4 a 8% do total de volume de suco processado. Esta etapa contribui para a qualidade do suco de uva, pois atua como uma etapa de clarificação, reduzindo assim problemas com turbidez. O resíduo da centrifugação do suco de uva apresenta 73,47% de umidade, o que justifica a secagem deste material, visando maior estabilidade das substâncias presentes e sua aplicação no desenvolvimento de novos produtos. Este resíduo possui 3,69% de proteína, 4,06% de fibra bruta e 9,32% de açúcares redutores. A composição de monossacarídeos do resíduo de uva consiste de ramnose, arabinose, xilose, manose, galactose, glicose e ácido galacturônico (HAAS et al., 2015). De acordo com Haas et al., (2016) o aproveitamento deste resíduo é de grande relevância, pois este material é uma excelente fonte de fenólicos, assim como de minerais e monossacarídeos. Devido às propriedades bioativas, existe uma vasta gama de aplicações potenciais para componentes extraíveis do resíduo de uva, como ingredientes de alimentos, cosméticos e nutracêuticos; e como corantes naturais e conservantes de alimentos.

Devido à crescente demanda por compostos nutracêuticos e antioxidantes, estudos com o resíduo de uva podem ser úteis para fins industriais. Neste contexto, o consumo de dietas ricas em polifenóis está associado à redução do risco de desenvolver doenças crônicas como aterosclerose, doença cardíaca, diabetes e câncer.

1.5 Composição química da uva

A uva é uma das maiores fontes de substâncias fenólicas, e a sua concentração depende do genótipo da uva, influência do clima, fatores geográficos, práticas de viticultura e tempo de maturação (MENG et al., 2012; CADOT et al., 2012). A baga geralmente é constituída de 6 a 12% de casca, 2 a 5% de semente e 85 a 92% de polpa. A polpa é constituída majoritariamente por 65 a 85% de água, 12 a 25% de açúcares redutores, 0,6 a 1,4% de ácidos orgânicos, 0,25 a 0,5% de substâncias minerais, 0,05 a 0,1% de compostos nitrogenados e diversas vitaminas hidrossolúveis e lipossolúveis (SANTANA, 2005). As sementes das uvas apresentam em sua composição fibras, óleo, proteínas, fenólicos, açúcares e minerais. As sementes possuem grande quantidade de substâncias fenólicas monoméricas, tais como (+)-catequina, (-)-epicatequina e (-) epicatequina-3-*O*-galato, e diméricos, triméricos e tetraméricos procianidinas, que atuam como agentes antimutagênicos e antivirais (JAYAPRAKASHA et al., 2003).

1.5.1 Composição fenólica

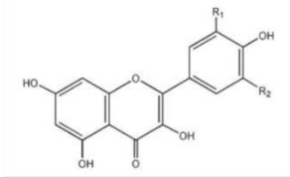
As substâncias fenólicas possuem ao menos um anel benzênico agrupado a um ou mais substituintes hidroxilas, provenientes do

metabolismo secundário das plantas (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006). A síntese de fenólicos pela videira é uma resposta metabólica de defesa frente às condições adversas ou de estresse que a planta é submetida, sejam elas bióticas (ataque de fungos) ou abióticas (radiação ultravioleta, variações de temperatura, déficit hídrico) (JACKSON, 2008). Os fenólicos são classificados de acordo com o número de grupos fenólicos que contêm e os elementos estruturais ligados a estes anéis, que incluem os ácidos fenólicos, flavonóides, estilbenos e lignanos (MANACH et al., 2004). Os fenólicos apresentam grande diversidade e podem ser subdivididos nos seguintes grupos: ácidos fenólicos, estilbenos e flavonoides (Figura 3).

Figura 3. Principais flavonoides da uva

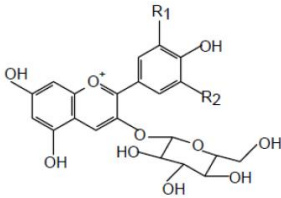
Flavonoides

Flavonóis



R₁	R₂	
OH	H	Quercetina
OH	OH	Miricetina
H	H	Campferol

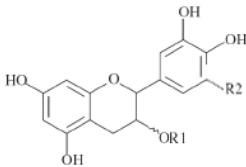
Antocianinas



R₁	R₂	
OCH ₃	OCH ₃	Malvidina
OH	OH	Delfinidina
OCH ₃	H	Peonidina
OH	H	Cianidina
OH	OCH ₃	Petunidina

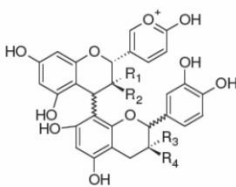
Flavanóis

Flavan-3-ols



R₁	R₂	
OH	H	Catequina
H	OH	Epicatequina

Procianidinas



	R₁	R₂	R₃	R₄
B 1	OH	H	H	OH
B 2	OH	H	OH	H
B 3	H	OH	H	OH
B 4	H	OH	OH	H

Flavonoides

Os flavonoides da uva apresentam uma estrutura química (C₆-C₃-C₆) formada por dois anéis benzênicos (denominados de A e B) ligados entre si por um anel heterocíclico pirano (JACKSON, 2008). Sua estrutura consiste em dois anéis aromáticos, A e B, ligados por ligação de três carbonos, usualmente na forma de anel heterocíclico. As variações nas configurações de substituição do anel C resultam na maioria das subclasses dos flavonoides (HOLLMAN; ARTS, 2000; BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006). Os flavonoides podem ser agrupados em três grandes classes com base na sua estrutura geral. Os dois anéis de benzeno estão ligados entre si por um grupo de três átomos de carbono. Os principais flavonoides da uva são os flavonóis, as antocianinas e os flavanóis (Figura 3), podendo ocorrer em sua forma livre, glicosilada ou acilada (RIBÉRAU-GAYON et al., 2006; GARRIDO; BORGES, 2013).

Flavonóis

Os flavonóis são provenientes da biossíntese dos flavonoides, a molécula de flavonol é caracterizada pela presença de uma insaturação no anel heterocíclico e um grupamento hidroxila na posição três (BOOTS; HAENEN; BAST, 2008). Os flavonóis da uva são encontrados principalmente na forma de glicosídeos e são sintetizados e armazenados nas cascas de uvas (RIBÉRAU-GAYON et al., 2006; JACKSON, 2008). Os derivados agliconas mais encontrados na uva são a quercetina, campferol e miricetina, dependendo da variedade podem

estar presentes em maior ou menor concentração (VILANOVA; MASA, 2008).

Os flavonóis são pigmentos amarelos ou incolores e sua síntese é influenciada diretamente pela sua exposição à luz. Os flavonóis desempenham um papel importante contra as radiações UV, sendo encontrados na casca da uva e folhas. A biossíntese dos flavonoides é induzida pela luz, portanto a presença de radiações UV favorece a síntese de flavonoides. Os principais flavonóis em uva são os 3-glicosídeos de quercetina. A concentração de flavonóis nos bagos de uva depende do estágio de desenvolvimento do fruto, genética e fatores ambientais. O teor de flavonóis está presente em pequenas concentrações em frutos verdes, mas durante a maturação ocorre o aumento constante no teor de flavonoides (MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009).

Flavanóis

Os principais flavanóis da uva são encontrados em sua forma monomérica (flavan-3-ol) ou condensados (proantocianidinas ou taninos condensados). Sua estrutura consiste em um núcleo flavânico formado por dois anéis aromáticos e um anel heterocíclico pirânico no qual é ligado o grupamento hidroxil na posição três (PRIEUR et al., 1994). Os flavanóis são encontrados como monómeros, mas também como oligómeros e polímeros (MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009). Os principais flavan-3-ols em uvas são a (+) -catequina e (-) -epicatequina. Os flavanóis oligômeros e polímeros são chamados de taninos condensados ou proantocianidinas.

Os flavonóis estão presentes em diversos tecidos da videira, incluindo folhas, caules e frutos. Estão presentes principalmente nas cascas e semente da uva, sendo que as proantocianidinas concentram-se principalmente na semente. A concentração de flavanol é maior em sementes do que em cascas, sendo que estas apresentam pequenas quantidades. No entanto a contribuição da casca pode ser superior ao das sementes em algumas variedades (MORENO-ARRIBAS; POLO; 2009; MATTIVI, 2011). Os flavan-3-ols encontrados na uva estão na forma livre e são representados por (+) catequina, (-) epicatequina, (-) epigallocatequina e (-) epicatequina galato (GÓMEZ-ALONSO; GARCÍA-ROMERO; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, 2007).

As proantocianidinas ou taninos condensados são oligômeros e polímeros de catequina e epicatequina (JACKSON, 2008). As proantocianidinas são responsáveis pelas características de adstringência de algumas frutas e bebidas, estando presentes em cascas, sementes e caules do fruto. As proantocianidinas atuam na proteção contra doenças cardiovasculares e como antioxidantes (TRAVAGLIA et al., 2011).

Antocianinas

As antocianinas estão localizadas principalmente na casca de uvas, com exceção de algumas variedades que também contém antocianinas na polpa. A estrutura das antocianinas consiste em dois anéis aromáticos ligados a um anel heterocíclico oxigenado, o cátion flavílium (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006). As principais antocianinas da uva são a malvidina, cianidina, delphinidina, peonidina e petunidina as quais se distinguem conforme o número e posição dos

grupos hidroxila e metoxila localizados no anel B da molécula (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006; JACKSON, 2008). Em geral, malvidina é a antocianina majoritária em variedades de uva tintas. As antocianinas são encontradas principalmente ligadas à molécula de glicose. A forma mais encontrada é como 3-glicosídeo, e se um segundo açúcar está presente, é quase sempre na posição 5 do anel. Em sua forma glicosilada, são encontradas como 3-glicosídios nas variedades de *Vitis vinifera*, e como 3,5-diglicosídios em espécies americanas e em variedades híbridas (NIXDORF; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, 2010).

As antocianinas apresentam alto potencial corante e podem ser utilizadas como pigmentos naturais, além da sua elevada capacidade antioxidante, anti-inflamatória e anticancerígena a qual já demonstrou inúmeros efeitos benéficos à saúde, como a prevenção da degeneração celular. Por isso, as antocianinas são largamente utilizadas para a produção de compostos nutraceuticos e alimentos funcionais (VALLS et al., 2009). A estabilidade das antocianinas pode ser afetada por diversos fatores tais como o pH, temperatura de estocagem, estrutura química, concentração, luz, oxigênio, solventes, flavonoides, proteínas e íons metálicos. A maior estabilidade das antocianinas é observada em pH ácido, baixas temperaturas, baixa concentração de oxigênio, ausência de luz e baixa atividade de água (SCHWARTZ et al., 2010).

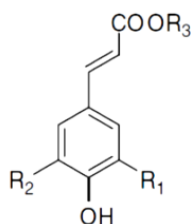
Ácidos fenólicos e estilbenos

Os ácidos fenólicos caracterizam-se por terem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila ou metoxila na molécula, conferindo propriedades

antioxidantes para os vegetais. Estes compostos são formados por um anel aromático e os substituintes ligados à sua estrutura, conferindo capacidade de sequestrar espécies reativas, como o radical hidroxilae o oxigênio singlete (MARINOVA;YANISHLIEVA, 2003). Os derivados do ácido benzoico e do ácido cinâmico constituem o grupo dos ácidos fenólicos e, o resveratrol é um dos principais representantes dos estilbenos (Figura 4).

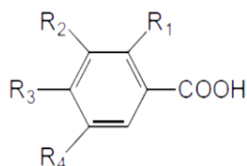
Figura 4. Principais ácidos fenólicos e estilbenos

Ácidos hidroxicinâmicos



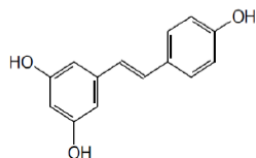
	R ₁	R ₂	R ₃
Cafeico	OH	H	H
Caftárico	OH	H	ác. tartárico
<i>p</i> -Coumárico	H	H	H
Ferúlico	OCH ₃	H	H

Ácidos hidroxibenzóicos

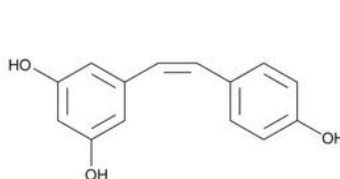


	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Gálico	H	OH	OH	OH
Protocateíco	H	OH	OH	H
Siríngico	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
Vanílico	H	OCH ₃	OH	H

Estilbenos



cis-resveratrol



trans-resveratrol

As substâncias fenólicas pertencentes ao grupo dos ácidos hidroxibenzoicos são o ácido protocateíco, ácido gálico, ácido siríngico e ácido vanílico. Estes derivados podem estar presentes na forma *cis* e *trans*, sendo que a forma *trans* é mais estável, portanto mais prevalente. Os hidroxicinâmicos são compostos aromáticos com três carbonos que formam uma cadeia lateral (C₆-C₃), como os ácidos caféico, ferúlico, *p*-cumárico e caftárico. Estes ácidos podem estar na forma livre, ligados entre si ou com outros compostos. Outras substâncias importantes são os ésteres de ácido tartárico, *p*-cumárico e ácido ferúlico e o glicosídeo de *trans-p*-cumárico (SOMERS et al., 1987). A capacidade antioxidante dos ácidos fenólicos e dos seus ésteres irá depender da sua estrutura, em relação ao número de grupos hidroxila presentes na molécula e de sua posição em relação ao grupo funcional carboxila, a adição de um segundo grupo hidroxila na posição orto ou paratambém aumenta a atividade antioxidante (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006).

Os estilbenos são uma subclasse de substâncias fenólicas que ocorre naturalmente em várias famílias de plantas, sendo que as uvas são consideradas as fontes dietéticas mais importantes deste composto. Os estilbenos podem ser biossintetizados por videiras como resposta de defesa ao estresse, como infecção microbiana e irradiação UV. O resveratrol (3-4'-5-hidroxiestilbeno) está entre os estilbenos mais relevantes na natureza, e este composto existe em duas formas isoméricas, sendo estas *cis* ou *trans*. A síntese deste composto em uvas está localizada principalmente na casca e praticamente ausente ou em baixa concentração na polpa do fruto (MORENO-ARRIBAS; POLO,

2009). A forma *trans* é amplamente estudado e relacionado com a prevenção de doenças cardiovasculares e cancerígenas.

1.5.2 Capacidade antioxidante

As substâncias fenólicas presentes na uva são reconhecidas por suas propriedades bioativas, devido ao efeito protetor sobre os danos oxidativos induzidos por radicais livres presentes em células e tecidos (MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009). Estudo realizado por Toaldo et al., (2015) indicou que a ingestão de suco de uva Bordô e Isabel (*Vitis Labrusca* L.) promove a eliminação de radicais livres e impede a peroxidação lipídica. O consumo de dietas ricas em polifenóis está associado a uma redução no risco de desenvolver doenças crônicas.

A capacidade antioxidante das substâncias fenólicas está relacionada à sua estrutura química, a qual possui um grupo aromático ligado à hidroxila que reage rapidamente com oxidantes na forma de radical livre originando um radical muito estável (FERNÁNDEZ-MAR et al., 2012). A atividade antioxidante *in vitro* é determinada por diferentes métodos, sendo os mais utilizados o método ABTS (ácido 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-ácido sulfônico), DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) e FRAP. Os métodos ABTS e DPPH tem como princípio o sequestro de radicais livres. O método FRAP tem como princípio a capacidade de redução do complexo férrico Fe^{3+} -2,4,6-tripiridil-s-triazina por compostos antioxidantes (CROSBY et al., 2006).

1.6 Propriedades bioativas das substâncias fenólicas da uva

A uva e os subprodutos da viticultura têm atraído uma atenção considerável como fontes de substâncias fenólicas bioativas, sendo utilizados para diversos fins nas indústrias de alimentos e farmacêutica (MAKRIS; BOSKOU; ANDRIKOPOULOS, 2007). Como exemplo de substâncias bioativas encontradas na uva podemos citar: *trans*-resveratrol, ácidos fenólicos, antocianinas e flavonoides estão presentes em concentrações elevadas na uva e no subproduto de uva (YU; AHMEDNA, 2013).

Estudos epidemiológicos relatam a relação entre a ingestão de alimentos ricos em polifenóis e a redução de doenças crônico-degenerativas (RIMM, 2002; CHIRA et al., 2008). As substâncias fenólicas possuem propriedades antioxidantes e contribuem para a redução da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e a agregação de plaquetas, além de possuírem propriedades cardioprotetoras e vasoprotetoras, incluindo anti-aterosclerótica, antiarrítmicas e ações vasorelaxantes (LEIFERT et al., 2008). Alguns estudos com antioxidantes naturais têm sido realizados com o intuito avaliar os efeitos benéficos das substâncias fenólicas sobre a saúde humana por meio da sua contribuição na prevenção de doenças cardiovasculares (EILAT-ADAR et al., 2013), doenças neurodegenerativas (JEONG et al., 2011), danos ao DNA (DE CAMARGO et al., 2014) e desenvolvimento de câncer (WANG et al., 2017). As propriedades anticancerígenas dos polifenóis são atribuídas à sua capacidade de iniciar mudanças na expressão gênica, resultando em apoptose ou

necrose de células cancerígenas, diminuindo a iniciação, promoção e progressão do tumor (RAMOS, 2011; LEE, 2014).

O resveratrol é um importante anti-inflamatório que tem sido intensamente estudado por suas propriedades benéficas à saúde, é o produto final da via da estilbeno-sintase nas videiras e as práticas de manejo da cultivar e da vinha estão relacionados diretamente com a concentração dessa substância (SIGNORELLI; GHIDONI, 2005). O resveratrol exibe propriedades antimutagênicas e antiproliferativas que contribuem para a prevenção da formação de tumores em vários tecidos, além de reduzir a inflamação geral e os distúrbios associados, incluindo o desenvolvimento de câncer. Esta substância melhora a quimio-sensibilidade de vários tipos de câncer à quimioterapia, devido ao seu envolvimento em várias moléculas de sinalização de estresse (SIGNORELLI et al., 2005; YANG et al., 2008). O resveratrol também atua como um antioxidante nas células neuronais, reduz o estresse oxidativo e previne a disfunção e a morte das células neurais. Apesar dos potenciais benefícios para a saúde, sua utilização como ingrediente nutracêutico na indústria de alimentos é atualmente restrito. Algumas das principais razões são a sua fraca solubilidade em água, instabilidade química e biodisponibilidade limitada. No entanto, os ingredientes bioativos podem ser protegidos da degradação durante o armazenamento por encapsulamento e liberados após a ingestão, viabilizando assim sua aplicação (DAVIDOV-PARDO; MCCLEMENTS, 2015).

Alguns fitoquímicos como a catequina e epicatequina podem suprimir a neuro-inflamação e fornecer proteção contra a doença de Parkinson, que ocorre devido a lesões cerebrais causadas pela produção de neurotoxinas endógenas (TAKAHASHI et al., 2015). As

antocianinas também podem melhorar a função cerebral cognitiva e fornecer habilidades neuroprotetoras reduzindo o estresse oxidativo associado à idade (ANDRES-LACUEVA et al., 2005). As proantocianidinas estão presentes principalmente na semente da uva, e têm demonstrado efeito positivo sobre a saúde humana, como ação protetora contra doenças cardiovasculares, que atuam na redução da pressão sanguínea e melhoria da função endotelial (NUNES et al., 2016).

Estudos recentes evidenciam a importância do stress oxidativo no desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Em estudo realizado por Melo et al. (2016) com engaço de uva, verificou-se que as substâncias fenólicas por diferentes mecanismos previnem o dano oxidativo. As substâncias fenólicas geralmente estão associadas às propriedades bioativas da uva e seus derivados, devido a sua atuação na modulação de mecanismos antioxidantes. Em estudo realizado por Toaldo et al., (2015) foi avaliado o efeito da ingestão de sucos de uva *Vitis Labrusca* L. sob biomarcadores de peroxidação lipídica, os autores observaram que o suco de uva proporcionou proteção contra a peroxidação lipídica, houve a melhoria da defesa antioxidante em indivíduos saudáveis após a ingestão de suco de uva, devido à capacidade das substâncias fenólicas de eliminar os radicais livres e impedir a peroxidação lipídica.

Há evidências crescentes que a uva e seus derivados por possuírem substâncias bioativas, contribuem para a proteção contra doenças cardiovasculares. Este fato é comprovado em testes *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* em animais e humanos (DANI et al., 2007; DANI et al., 2008; TOALDO et al., 2015). Os efeitos benéficos destas substâncias

bioativas parecem ser mediados por um grande número de vias bioquímicas e mecanismos de sinalização que atuam de forma independente ou em sinergia (LEIFERT et al., 2008). O desenvolvimento de produtos farmacêuticos ou alimentares destinados à redução de doenças cardiovasculares está em expansão. Portanto, sugere-se que a utilização do resíduo do suco de uva pode ser uma alternativa útil na prevenção de doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e cancerígenas, embora maiores estudos ainda sejam necessários.

1.7 Minerais

O consumo de minerais na dieta é extremamente importante para o perfeito funcionamento do metabolismo humano. Os minerais são classificados como macro ou microelementos. Os macroelementos são necessários em quantidades relativamente maiores na dieta humana, como o Ca, P, Na, K e Mg. Os microelementos são nutrientes necessários para manter a integridade celular e do metabolismo, no entanto são necessárias pequenas quantidades na dieta (LEMBERKOVICS et al., 2002). Os minerais presentes nas uvas estão principalmente nas cascas, sementes e parede celular da polpa da uva (JACKSON, 2008). A presença dos metais como o Pb, Cu, Al, Ni, Cr, Sr e Ba em uvas deve-se as práticas agrícolas aplicadas nos vinhedos, tais como o uso de fungicidas de cobre e produtos fitossanitários (TOALDO et al., 2013). Os metais e semimetais como o Pb, Al, Hg, Cd, Sn, As e Se são potencialmente tóxicos, o que pode ocasionar sintomas

agudos nos rins, fígado, coração, sistema vascular e imunológico (CAMPOS et al., 2010).

O suco de uva apresenta elevadas concentrações para os minerais K, Ca, Na e Mg. Os microelementos Mn, Zn, Fe, Co e Se, e os oligoelementos Cu, Pb, As, Al e Ni também estão presentes em sucos de uva, sendo que o Fe e Mn são os micronutrientes presentes em maiores concentrações (TOALDO et al., 2015). A ingestão insuficiente ou excessiva de alguns minerais pode ocasionar alguns danos à saúde. O ferro possui uma importante função na prevenção da anemia, já a deficiência de magnésio pode ocasionar espasmos musculares e tremores (ISERI et al., 1984). Em vinhos, os macroelementos presentes em maiores concentrações são o K, Na, Mg e Ca (PANCERI et al., 2015).

Em estudo de Canizo et al. (2018) a composição mineral de sementes de cinco variedades de uva foi avaliada, e o Fe foi o elemento mais abundante encontrado nas sementes, seguido pelo Mn, Zn e Cu. A concentração de Fe variou 37,5 a 44,2 $\mu\text{g/g}$, já a concentração de Mn variou de 15,7 a 20,3 $\mu\text{g/g}$, enquanto a de Zn e Cu em sementes de uva estava na faixa de 16,5 a 18,5 $\mu\text{g/g}$ e 9,0 a 13 $\mu\text{g/g}$, respectivamente. O Fe, entre outras funções, está ligado à produção de células do sangue, e o Zn é essencial para o sistema imunológico. O Mn é um elemento essencial, sua deficiência pode resultar em anormalidades esqueléticas e reprodutivas (MIRONEASA et al., 2010).

O macroelemento presente em maior concentração no resíduo de uva obtido da centrifugação do suco foi o K (9695,71 mg/kg), seguindo pelo Ca, Mg e Na (1228,11; 326,00 e 11,40 mg/kg) e o microelemento presente em maior concentração foi o ferro (156,92

mg/kg) (HAAS et al., 2016), o que comprova que a uva e seus derivados podem ser utilizados como importante fonte de minerais para a dieta humana. A deficiência de alguns minerais podem provocar danos à saúde, como por exemplo a baixa ingestão de potássio pode provocar hipertensão e osteoporose, já a deficiência de cálcio na dieta pode ocasionar vários distúrbios como a osteoporose e doenças crônicas como o câncer de cólon e hipertensão. No entanto, a ingestão excessiva de cálcio pode ocasionar hipercalcemia, o que ocasiona a calcificação excessiva nos rins. Juntamente com o cálcio, o potássio é importante na regulação da atividade neuromuscular e promove o crescimento muscular (WOOD et al., 1997). O sódio é um macroelemento essencial para a manutenção do correto funcionamento do metabolismo humano, mas em excesso pode causar edema e hipertensão (CAMPOS et al., 2010).

Estudos que visem à quantificação dos micro e macroelementos, especialmente nos resíduos de uva, são importantes, pois permitem obter informações quanto às características nutritivas deste alimento, principalmente no que se refere à composição elementar após a simulação gastrointestinal, visando uma futura aplicação deste material.

1.8 Modelo de digestão *in vitro*

Os modelos de digestão *in vitro* são amplamente utilizados para simular o processo de digestão *in vivo*. Estes modelos visam reproduzir as condições fisiológicas, utilizando enzimas digestivas, pH, tempo de digestão e sais biliares similares ao modelo gastrointestinal *in vivo*

(MINEKUS et al., 2014). A digestão gastrointestinal simulada permite estimar o efeito das matrizes alimentares quanto à bioacessibilidade *in vitro* de determinados compostos, sendo mais simples e rápida quando comparada com ensaios *in vivo*, que são caros e de longo prazo. Apesar de sua relevância fisiológica, os ensaios *in vivo* nem sempre podem ser realizados por razões éticas, limitações técnicas, custo e alta variabilidade interindividual como estado fisiológico e patológico de cada indivíduo. Para contornar essas limitações, o uso de métodos *in vitro* vem sendo utilizado como alternativa para avaliar o efeito da digestão dos alimentos na bioacessibilidade de determinadas substâncias (GUERRA et al., 2012; MÉNARD et al., 2014). A bioacessibilidade é definida como a quantidade de um componente que é liberado do alimentos no trato gastrointestinal (GI) e, portanto, disponível para absorção (HEANEY, 2001). Enquanto isso, a biodisponibilidade é a porção dos nutrientes digeridos ou fitoquímicos que são então absorvidos e metabolizados por vias normais e normalmente é medida por métodos *in vivo* (SRINI SRINIVASAN, 2001).

Os modelos de digestão *in vitro* são classificados como estáticos ou dinâmicos. Os modelos estáticos simulam de uma forma simplificada o processo de digestão que se inicia na boca, seguindo para o estômago e intestino delgado. Neste método os processos fisiológicos como os movimentos peristálticos ou a existência da microbiota intestinal são omitidos (GONZÁLEZ-ARIAS et al., 2013), e é amplamente utilizado em diversos estudos para simular o trato gastrointestinal humano (TENORE, et al., 2013; CARBONELL-CAPELLA et al., 2015). Os modelos dinâmicos utilizam pH, força iônica e concentrações de enzimas fixas. Por isso, estes modelos são

utilizados como técnicas de triagem, quando um grande número de alimentos é submetido à digestão, a fim de identificar os principais parâmetros que podem afetar a digestão do alimento (MÉNARD et al., 2014).

O modelo de digestão *in vitro* é apresentado em três etapas principais, sendo estas a boca, estômago e duodeno, onde as condições como pH, fluídos, enzimas e sais biliares são ajustadas e controladas. Na boca (fase oral) ocorre a trituração do alimento e ação da enzima α -amilase salivar. Nesta etapa o pH no interior da cavidade bucal é de aproximadamente 6,8 e o tempo de digestão é no máximo de cinco minutos (VERSANTVOORT et al., 2005). O bolo alimentar resultante da ação mecânica e enzimática na boca é transportado através do esôfago para o estômago. O estômago (fase gástrica) apresenta uma elevada acidez, facilitando a produção de pepsinogênio em pepsina, degradando proteínas e produzindo aminoácidos, oligopeptídeos e polipeptídeos. Já no intestino delgado (fase intestinal) a enzima pancreatina e os sais biliares fazem a segunda digestão. Após todas as etapas de digestão *in vitro* o composto de interesse poderá ser absorvido, metabolizado e utilizado na manutenção do organismo (GONZÁLEZ-ARIAS et al., 2013).

A bioacessibilidade das substâncias fenólicas é afetada por fatores relacionados diretamente com o alimento, tais como a interação com as proteínas, fibras e gordura. Alguns estudos comprovam o efeito da digestão gastrointestinal *in vitro* sob a estabilidade das substâncias fenólicas (McDOUGALL et al., 2005) e matrizes de alimentos sólidas (VALLEJO et al., 2004; SAURA-CALIXTO et al., 2007). A quantidade de fitoquímicos presentes em um alimento não reflete a concentração

total disponível para a metabolização pelo organismo humano, uma vez que apenas as substâncias que não são degradadas estarão biodisponíveis para absorção e desempenho de sua função biológica no organismo. Uma vez digeridos, os componentes dos alimentos são constantemente expostos a diferentes condições físicas, químicas e bioquímicas. Como consequência, os compostos bioativos podem ser modificados e sua atividade biológica alterada (MOSELE et al., 2016). Dessa maneira demonstra-se a importância de testes como a digestão *in vitro*, pois são capazes de simular condições fisiológicas do processo digestivo humano, incluindo boca, estômago e intestino (DE LIMA et al., 2017).

Os compostos bioativos da dieta podem exercer suas propriedades benéficas no organismo humano se atingirem os tecidos alvo em concentrações biologicamente ativas. Para serem absorvidos pelo sistema de circulação, os compostos bioativos devem ser inicialmente liberados da matriz alimentar e transformados em formas bioacessíveis no trato gastrointestinal (CARBONELL-CAPELLA et al., 2014). As proantocianidinas são compostos de alta massa molar e devem ser degradadas em moléculas menores durante a digestão e antes da absorção pelas células intestinais. Os flavonóides β -glicosilados são absorvidos em quantidades mínimas no intestino delgado e se uma molécula de açúcar adicional estiver ligada ao flavonóide, como na quercetina, o composto deve atingir o intestino grosso para que as porções de açúcar sejam hidrolisadas para assim serem transportadas para as células epiteliais do intestino e possivelmente absorvidas (REIN et al., 2013).

Avaliar a bioacessibilidade de diferentes matrizes alimentares é importante para inserir na dieta alimentos com propriedades funcionais e nutracêuticas. A uva e seus derivados apresentam uma interessante composição fenólica e elementar, portanto avaliar o comportamento destes compostos utilizando uma simulação gastrointestinal *in vitro* torna-se extremamente essencial para compreender o efeito do sistema digestivo sob a composição do alimento.

1.9 Potencial anti-proliferativo de compostos bioativos presentes em alimentos de origem vegetal

Os alimentos de origem vegetal são fontes de substâncias fenólicas com alta capacidade antioxidante, portanto contribuem para a prevenção de diversos tipos de câncer. A carcinogênese é um processo dinâmico que envolve inúmeras etapas, como iniciação, promoção e progressão, onde ocorre a transformação de células normais em malignas (ULLAH et al., 2014). Na etapa de iniciação da carcinogênese ocorre a alteração irreversível do DNA, onde pode promover a mutação da célula. A etapa de promoção é caracterizada pela proliferação celular, ocorre a conversão da célula iniciada em célula pré-maligna (IRIGARAY; BELPOMME, 2010). A progressão da célula em maligna ocorre por divisão e proliferação celular de maneira incontrolável, onde ocorre mudança nas características bioquímicas, metabólicas e morfológicas das células (OLIVEIRA et al., 2007). As células normais que formam os tecidos do corpo humano são capazes de se multiplicar por meio de um processo contínuo que é natural. A maioria das células normais cresce, multiplica-se e morre de maneira ordenada. O

crescimento das células cancerígenas é diferente do crescimento das células normais. As células cancerígenas, em vez de morrerem, continuam crescendo incontrolavelmente, formando outras novas células anormais (BRASIL, 2011).

O câncer é um dos principais problemas de saúde pública no mundo, com milhões de novos pacientes diagnosticados a cada ano e muitas mortes resultantes desta doença. Estima-se que no Brasil houve a ocorrência de cerca de 600 mil novos casos de câncer entre 2016 e 2017. Os tipos de câncer mais incidentes no mundo foram pulmão (1,8 milhão), mama (1,7 milhão), intestino (1,4 milhão) e próstata (1,1 milhão). Nos homens, os mais frequentes foram pulmão (16,7%), próstata (15,0%), intestino (10,0%), estômago (8,5%) e fígado (7,5%). Em mulheres, as maiores frequências encontradas foram mama (25,2%), intestino (9,2%), pulmão (8,7%), colo do útero (7,9%) e estômago (4,8%) (BRASIL, 2015). Os fatores como etnia, idade, estilo de vida e dieta têm um impacto significativo na expressão e progressão desses cânceres. Estima-se que 30% das mortes por câncer estão relacionadas com riscos comportamentais e alimentares, incluindo alto índice de massa corporal, falta de atividade física, uso de tabaco, ingestão de álcool e baixa ingestão de alimentos de origem vegetal (BRAY et al., 2013).

O câncer hepático é o quinto câncer mais frequentemente diagnosticado em homens em todo o mundo, sendo a segunda causa mais frequente de morte por câncer (JERNAL et al., 2011; TORRE et al., 2015). Nas mulheres o câncer hepático é o décimo segundo mais diagnosticado e a sexta principal causa de morte. As taxas de incidência de câncer hepático estão aumentando em muitas partes do mundo,

consequencia da obesidade e do aumento da infecção pelo vírus da hepatite C (JERNAL et al., 2011). Aproximadamente 90% dos casos de carcinoma hepatocelular são oriundos de fatores de risco bem definidos, e dentre os fatores de risco mais frequentes estão as infecções por vírus da hepatite B e C, alcoolismo e exposição à aflatoxina (PARKIN et al., 2005). Os quimioterápicos clássicos não possuem indicação para este tipo de câncer devido a problemas com o metabolismo hepático geralmente comprometido (EDELIN et al., 2009).

O câncer de estômago ou gástrico é considerado um dos tipos de câncer com maiores índices de mortalidade. O câncer de estômago pode ser classificado como adenocarcinoma, linfoma ou leiomiossarcoma, sendo que adenocarcinoma é o mais frequentemente observado (HWANG et al., 1994). No Brasil, a estimativa para novos casos de câncer de estômago em 2018 é de aproximadamente 21.000, sendo a maior incidência prevista para a região Sudeste (9.080) e Nordeste (5.250) (BRASIL, 2017). O câncer de estômago é a terceira causa de morte por câncer no mundo e o quinto tipo mais incidente. De acordo Bornschein et al. (2010) a incidência deste câncer tem relação com a presença da bactéria *Helicobacter pylori*. Na gastrite inflamatória crônica associada com a infecção por *H. pylori* proporciona mudanças histopatológicas na mucosa gástrica, o que progride de gastrite crônica a atrofia, metaplasia, displasia e carcinoma (LEE et al., 2012). A *H. pylori* está associada a um risco aproximadamente duas vezes maior de desenvolver câncer de estômago (ESLICK, 2006).

O câncer de cólon é uma neoplasia maligna comum no sistema digestivo, sendo o terceiro câncer mais comum e a segunda principal causa de morte relacionada ao câncer em todo o mundo (HEMERYCK

et al., 2016). No Brasil o câncer de cólon e reto em homens é o segundo mais frequente na região Sudeste e terceiro nas regiões Sul e Centro-Oeste, nas regiões Nordeste e Norte ocupa a quarta posição. Para as mulheres é o segundo mais frequente nas regiões Sul e Sudeste, e o terceiro mais frequente nas regiões, Centro-Oeste, Nordeste e na região Norte. O número de novos casos de câncer de cólon e reto estimado para o Brasil é de 17.380 casos em homens e de 18.980 em mulheres em 2018 e 2019 (BRASIL, 2017). Diversos fatores de risco relacionados com a incidência de câncer de cólon foram identificados, entre eles está a dieta rica em gordura animal e baixa ingestão de alimentos de origem vegetal, obesidade, diabetes e tabagismo (KELLY et al., 2012; PERDUE et al., 2014).

Os produtos naturais da dieta têm sido amplamente investigados para a prevenção e controle do câncer de cólon. Os alimentos de origem vegetal contêm fibras e fitoquímicos que podem restringir o desenvolvimento e a progressão do câncer de cólon de várias maneiras, como proteger contra carcinógenos do cólon, inibir o crescimento de tumores e metástases e induzir a apoptose e a interrupção do ciclo celular (TAO et al., 2018). De acordo com alguns estudos, o consumo de alimentos de origem vegetal foi negativamente associado com a incidência de câncer de cólon (LEENDERS et al., 2015; VOGTMANN et al., 2013). O campferol bloqueou a progressão do ciclo celular de células HT-29 (adenocarcinoma de cólon) pela promoção da apoptose por meio da ativação dos receptores da morte da superfície celular e via mitocondrial (LEE et al., 2014).

As sementes de uva apresentam efeitos protetores contra vários tipos de câncer, fator atribuído a substâncias fenólicas

como catequina e procianidina (DINICOLA et al., 2012; SIGNORELLI et al., 2015). Estudos farmacocinéticos mostraram que *in vivo* assementes de uva dificilmente podem ser absorvidos ou metabolizados durante o trânsito do trato gastrointestinal, permitindo que as substâncias fenólicas atinjam o cólon em altas concentrações (FRAGA; OTEIZA et al., 2011). Essa característica metabólica sugere que as sementes de uva agem como um agente quimiopreventivo e quimioterápico para o câncer de cólon.

Os flavonóis constituem um dos principais grupos de antioxidantes que revelam atividades antiproliferativas em várias linhagens celulares de câncer. A quercetina, catequina e epicatequina isoladas das cascas de maçã, mostraram atividades antiproliferativas contra células de câncer de fígado (HepG2) (HE; LIU, 2008). O campferol e quercetina isolados a partir de extratos de morango mostraram atividades antiproliferativas contra células de câncer de fígado (HepG2) e câncer do cólon (Caco-2) (ZHANG et al., 2008). Os flavanóis também demonstram atividades antiproliferativas contra várias linhagens cancerígenas. O *trans*-resveratrol demonstra ser um inibidor dos fatores associados à viabilidade e à proliferação de células tumorais em células de câncer de pele (YANG et al., 2008).

O ácido gálico demonstrou potencial terapêutico para controlar a metástase tumoral do adenocarcinoma de estômago, também apresentou atividade antiproliferativa contra células de câncer de mama (HO et al., 2010; LIU et al., 2012; LUO et al. al., 2011). O ácido gálico mostrou uma atividade pró-apoptótica mediada pela produção de H₂O₂ em células cancerígenas de leucemia (FABIANI et al., 2011). Os ácidos hidroxicinâmicos constituem um grupo importante de fenólicos, com

atividade inibitória na proliferação de linhagens celulares de câncer. A eficácia dos ácidos hidroxicinâmicos, tais como cafeico e ferúlico, foram mais eficazes em causar danos ao DNA, sendo o ácido cafeico o mais ativo entre os ácidos avaliados (FAN et al., 2009). O ácido cafeico também apresentou efeitos antiproliferativos contra células de câncer de cólon (HASHIM et al., 2008). O ácido cafeico e ferúlico isolados de cascas de maçã mostraram atividades antiproliferativas contra células de câncer de mama e fígado (HE; LIU, 2008).

Estudos descrevem que a presença de substâncias fenólicas induz a apoptose de células tumorais da próstata e suprime a proliferação celular de células cancerígenas gástricas (GEE; HARA; JOHNSON, 2002; WANG; STONER, 2008). Em estudo de Peixoto et al. (2018), o bagaço de uvas tintas foi separado em cascas e sementes com o objetivo de avaliar a ação antiproliferativa. As cascas não foram capazes de inibir o crescimento celular do adenocarcinoma de mama, pulmão, cervical e hepatocelular, enquanto que as sementes inibiram o crescimento do carcinoma da mama e carcinoma cervical. A citotoxicidade observada na linhagem de câncer de mama mostrou-se fortemente correlacionada com a presença de substâncias fenólicas. A cianidina-3-glicosídeo mostrou atividades antiproliferativas em linhagens celulares de câncer de fígado (HepG2), câncer de mama (MCF-7) e câncer do cólon (Caco-2) (ZHANG et al., 2008). A cianidina-3-glicosídeo e delfinidina-3-glicosídeo isolados da casca da uva inibiram o crescimento de células de câncer de mama (FERNANDES et al., 2010). Os estudos comprovam que as substâncias fenólicas presentes em alimentos de origem vegetal podem inibir o crescimento de diferentes linhagens de cânceres.

1.9.1 Culturas de células

A cultura de células *in vitro* permite estudar o crescimento, diferenciação e morte celular em ambiente controlado. A cultura de células *in vitro* proporciona vantagens em relação ao sistema *in vivo*, como o controle de pH, temperatura, pressão osmótica, tensão de CO₂ e O₂. As condições de cultura variam amplamente para cada linhagem celular, mas o ambiente artificial no qual as células são cultivadas consiste de um recipiente adequado contendo um substrato ou meio que fornece nutrientes essenciais (aminoácidos, carboidratos, vitaminas, minerais), hormônios e gases (O₂, CO₂) e regula o ambiente físico-químico (pH, pressão osmótica, temperatura). Entre as principais vantagens da utilização de cultura celular é a consistência e a reprodutibilidade dos resultados proporcionados (FRESHNEY, 2005).

As células em cultura podem ser divididas em três categorias baseadas na sua morfologia, sendo estas as células fibroblásticas que possuem formas alongadas e crescem ligadas a um substrato, células epiteliais que são poligonais com dimensões mais regulares e crescem em um substrato e as células de linfoblastos são esféricas e geralmente crescem em suspensão. As culturas celulares também são classificadas de acordo com a capacidade de aderência a uma determinada superfície, podendo crescer formando monocamadas ou em suspensão. As células cultivadas em monocamadas são aderentes em substrato sólido e as células em suspensão em meio de cultura não aderem ao substrato (FRESHNEY, 2005).

Além das características baseadas na morfologia celular e capacidade de aderência, as células podem ser classificadas de acordo

com o tipo de cultura, ou seja, em células primárias, células estabelecidas e células transformadas. A cultura primária é obtida a partir do crescimento de células oriundas de um tecido obtido por desagregação mecânica ou enzimática. As células primárias apresentam as características do tecido de origem, sendo que seu crescimento em cultura ocorre por um determinado período de tempo. As características genótípicas e fenotípicas desde tipo de célula contribuem para o estudo do comportamento de algumas células *in vitro*. As células primárias conseguem manter suas características originais por um tempo de vida relativamente curto (FRESHNEY, 2005). As linhagens de células contínuas ou estabelecidas apresentam as características do material de origem e possuem alta capacidade de proliferação. Esta linhagem pode ser mantida em cultura por um longo período de tempo. Já as células transformadas são aquelas que não apresentam mais semelhança com a morfologia e genética do tecido original, sendo muito utilizadas em estudos de citotoxicidade. Esta linhagem por ser obtida diretamente dos tecidos com mutação, como os tecidos tumorais, e apresenta enorme capacidade de proliferação quando em cultura. Os tecidos com mutações genéticas ou cancerígenas são obtidos por meio da desregulação do ciclo celular, o que resulta numa perda progressiva da diferenciação celular e um crescimento celular não controlado das células dos tecidos e órgãos (STRATTON; CAMPBELL; FUTREAL, 2009).

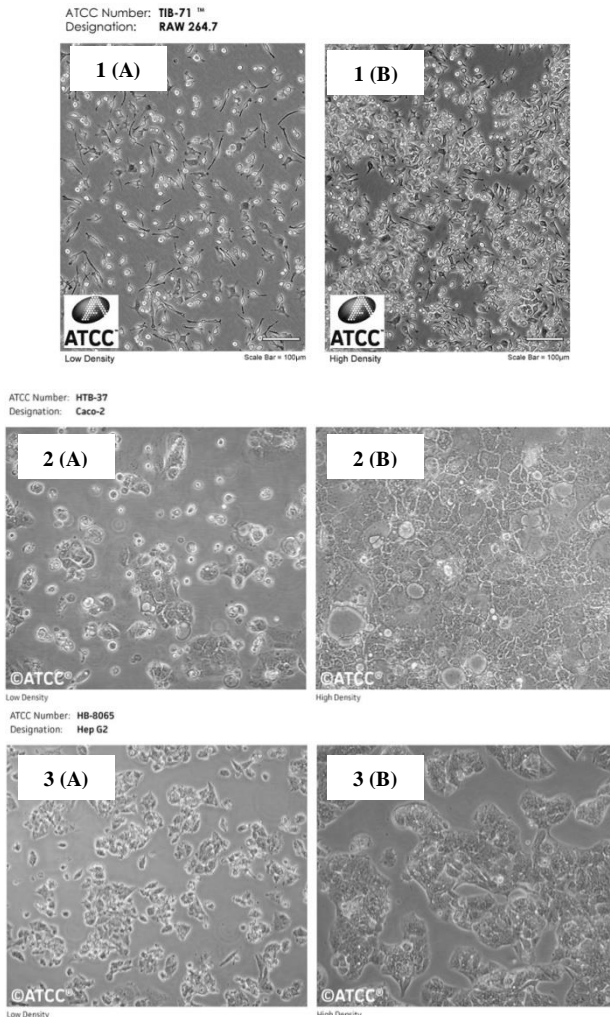
A linhagem celular Caco-2 (Figura 5) é originalmente derivada do carcinoma do cólon e tem sido amplamente utilizada como um modelo *in vitro* da barreira epitelial intestinal para estudos de transporte e retenção de várias substâncias químicas (BALIMANE et al., 2000). Esta linhagem celular apresenta características morfológicas e

bioquímicas dos enterócitos (polaridade, junções, sistemas de transporte específicos e enzimas) após diferenciação em cultura (HIDALGO et al., 1989). A linhagem celular HepG2 é derivada do carcinoma hepatocelular, apresenta morfologia epitelial e crescimento aderente. A *linhagem celular RAW 264.7* são macrófagos obtidos de células da linhagem osteoblástica e em tecido subcutâneo de camundongos (ATCC, 2012). As linhagens de adenocarcinoma gástrico ACP02 e ACP03 (Figura 5) são provenientes das regiões da cárdia e do antro pilórico do estômago, respectivamente. As linhagens gástricas (MN01, ACP02 e ACP03) se proliferam em monocamada e apresentam morfologia semelhante a fibroblastos, com extremidades afiladas (Figura 6) (PENNA, 2017).

Os ensaios de citotoxicidade são realizados para avaliar a atividade antitumoral de compostos químicos em linhagens celulares, sendo baseado no crescimento e multiplicação da linhagem celular medida por indicador de crescimento pela coloração e intensidade de cor que é proporcional ao número de células presentes (HOUGHTON et al., 2007). A citotoxicidade pode ser estabelecida em culturas de células tumorais de várias linhagens através das variações da morfologia celular utilizando o método de azul de tripan, que se baseiam na perda da integridade da membrana celular das células não viáveis causando a captação do corante. A viabilidade celular pode ser analisada pelo método MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] e SRB (*Sulforodamina B*). O MTT é um ensaio de proliferação celular que detecta células vivas (MOSMANN, 1983). O princípio do ensaio da SRB baseia-se na habilidade que tem este composto de se ligar a componentes proteicos das células, fixados pelo

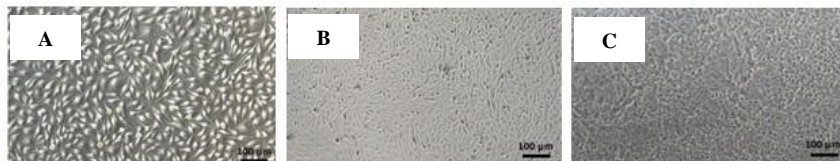
ácido tricloroacético; ou seja, o método independe da atividade metabólica das células, ao contrário do MTT que depende de uma enzima mitocondrial (HOUGHTON et al., 2007).

Figura 5. Células carcinogênicas em baixa (A) e alta densidade (B) para as linhagens Raw 264.7 (1), Caco-2 (2) e HepG2 (3).



Fonte: ATCC (American Type Culture Collection).

Figura 6. Células gástricas da linhagem Mn01 (A), ACP02 (B) e ACP03 (C).



Fonte: Penna (2017)

1.9.1.1 Atividade antiproliferativa *in vitro*

A atividade antiproliferativa *in vitro* tem como intuito avaliar a capacidade de determinada substância de inibir a proliferação celular, principalmente no que diz respeito as células cancerígenas. A morte celular pode ser classificada de acordo com as características morfológicas, em apoptose, necrótica, autofágica ou associada à mitose. Na morte celular definida como apoptose ocorre a retração da célula, que gera a perda da aderência com a matriz extracelular e outras células. A apoptose ocorre nas mais diversas situações, como por exemplo, na organogênese e hematopoiese normal e patológica, na reposição fisiológica de certos tecidos maduros, na atrofia dos órgãos, na resposta inflamatória e na eliminação de células após dano celular por agentes genotóxicos. A necrose é um tipo de morte na qual as células sofrem um insulto que resulta no aumento do volume celular, agregação da cromatina, desorganização do citoplasma, perda da integridade da membrana plasmática e consequente ruptura celular. Durante a necrose, o conteúdo celular é liberado, causando dano às células vizinhas e uma reação inflamatória no local. A autofagia é um processo adaptativo conservado evolutivamente e controlado geneticamente. Ela ocorre em

resposta a um estresse metabólico que resulta na degradação de componentes celulares (GALLUZI et al., 2007).

Nas últimas décadas, os fitoquímicos têm atraído a atenção como agentes anticancerígenos. Diversos estudos indicaram o potencial anticâncer de substâncias fenólicas, e em particular a sua capacidade para inibir a proliferação das células cancerígenas, devido aos seus efeitos sobre o ciclo celular (LEE et al., 2006; RAMOS et al., 2011; VU et al., 2012). O alimento para ser considerado antiproliferativo deve apresentar a inibição do crescimento celular superior a 50% (NERI-NUMA et al., 2013). Em estudo realizado por Jara-Palacios et al. (2015) com bagaço de uva branca obtido do processo de vinificação inibiu a proliferação de células em 52,1% quando incubadas por 48h, enquanto que a catequina, epicatequina, quercetina e ácido gálico inibiram o crescimento de 65,2, 62,2, 81,0 e 71,0%, respectivamente, em 72 h. O desenvolvimento de produtos quimiopreventivos a partir de subprodutos da indústria vitícola devido a sua composição fenólica representa uma fonte sustentável e de baixo custo (JARA-PALACIOS et al., 2015).

CAPÍTULO 2

OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DO PERFIL FENÓLICO E EXTRATOS BIOATIVOS DO RESÍDUO DE UVA OBTIDO DO PROCESSAMENTO DO SUCO

Isabel Cristina da Silva Haas, Isabela Maia Toaldo, Vívian Maria Burin, Marilde T. Bordignon-Luiz.

Department of Food Science and Technology, Federal University of Santa Catarina, Admar Gonzaga Rd. 1346, Itacorubi, 88034-001, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.

Nota: O texto e dados discutidos neste capítulo foram reproduzidos ou adaptados da publicação de autoria de Isabel Cristina da Silva Haas, Isabela Maia Toaldo, Vívian Maria Burin e Marilde T. Bordignon-Luiz, disponível em *Industrial Crops and Products*, v.112, p.593-601. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.12.058>, reproduzido com a Elsevier.

RESUMO

Um método simples e rápido de extração combinando agitação mecânica orbital (AMO) e extração hidroalcoólica sólido-líquido (EHSL) foi otimizado para determinar o perfil bioativo do resíduo de uva obtido do processamento do suco. Utilizando este material potencialmente reutilizável, extrações sólido-líquido foram realizadas utilizando solvente:água e o método de agitação orbital. O perfil fenólico deste resíduo foi identificado por CLAE-DAD. As extrações dos compostos fenólicos foram maiores com o aumento da polaridade do solvente combinada com o método de agitação de placa ou orbital. Os extratos do resíduo de uva apresentaram altos níveis de flavanóis, ácidos fenólicos, antocianinas e estilbenos, os compostos fenólicos foram significativamente maiores nos extratos metanólicos. O planejamento fatorial completo de três níveis permitiu a otimização do tempo de extração, concentração de solvente e razão sólido-líquido. Para a extração otimizada de antocianinas foi utilizada a relação sólido-líquido de 1:10 (p/v), tempo de extração de 5 min e concentração de solvente de 85%. A malvidina-3-*O*-glicosídeo e malvidina-3,5-glicosídeo foram as antocianinas majoritárias no resíduo de uva Isabel. A catequina, epicatequina, ácido ferúlico, ácido caféico e *trans*-resveratrol são potentes antioxidantes e foram encontrados em altas concentrações nos extratos, sugerindo um interesse bioativo para aplicações tecnológicas.

Palavras-chave: Potencial bioativo. Polifenóis. Extração sólido-líquido. Resíduo da viticultura.

ABSTRACT

A simple and fast extraction method combining mechanical orbital agitation (MOA) and hydroalcoholic solidliquid extraction (HSLE) was optimized for polyphenol enrichment and bioactive profiling of extractives of the non-pomace residue obtained from grape industries. Using this potentially reusable material, solid-liquid extractions using a mixture of organic-water solvents and rotational agitation were evaluated in order to obtain antioxidant rich extractives of this highly-colored residue, which is industrially discarded as a solid waste. In addition, the phenolic profile of this residue was firstly identified by RP-LC DAD. The extraction of many phenolic compounds was greatly increased by increasing solvent polarity combined with plate or orbital agitation. The non-pomace extractives showed high levels of flavanols, phenolic acids, anthocyanins and stilbene, whereas polyphenolic concentrations were significantly higher in methanolic extracts. The complete three-level factorial design allowed the optimization of extraction time, solvent concentration, and solid-liquid ratio, leading to an optimal extraction of anthocyanins at a solvent:solid ratio of 1:10 (w/v), extraction time of 5 min and solvent concentration of 85%. Malvidin glucosides were the major phenolics in the non-pomace residue. Catechin, epicatechin, ferulic acid, caffeic acid and trans-resveratrol, which are potent antioxidants, were found at high concentrations in the extractives, suggesting a bioactive interest for further technological applications.

Keywords: Bioactive potential. Polyphenols.Solid-liquid extraction.Viticulture residue.

1. INTRODUÇÃO

A uva e seus subprodutos são fonte de polifenóis que apresentam alta atividade antioxidante (SPIGNO; DE FAVERI, 2007). O suco de uva é um produto derivado que contém compostos fenólicos com propriedades bioativas. No continente americano, as uvas *V. labrusca* L. são tradicionalmente utilizadas para a produção de sucos de uva, principalmente as variedades Bordô e Isabel (RIZZON; MENEGUZZO, 2007).

A produção e o consumo global de uvas aumentou significativamente no período de 2000 a 2014. A produção mundial de uvas em 2014 atingiu quase 27 milhões de toneladas (FAO, 2016). Durante o processamento das uvas, são gerados alguns resíduos, como o bagaço e o resíduo da centrifugação do suco. O bagaço é constituído pela casca e sementes da uva, sendo removido na etapa de prensagem, e estima-se que aproximadamente 20% do volume de uvas processadas correspondem ao bagaço (SPANGHERO et al., 2009). Após a prensagem, uma etapa de centrifugação é utilizada para clarificação do suco, a fim de separar os sólidos suspensos e reduzir a turbidez do suco. Os sólidos suspensos correspondem a aproximadamente 4-8% do suco de uva processado. A alta geração deste resíduo representa uma grande preocupação para as vinícolas, uma vez que a eliminação inadequada desta matriz pode levar a impactos ambientais. A característica perecível deste resíduo indica a necessidade de realizar a caracterização química afim de explorar seu potencial bioativo e tornar possível seu uso pela indústria química e farmacêutica (HAAS et al., 2016).

Os subprodutos da viticultura contêm altas concentrações de compostos fenólicos, e o consumo de alimentos ricos em polifenóis contribui para a redução do risco de doenças crônicas, incluindo doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, carcinogênicas e Alzheimer (VAUZOUR et al., 2010; HAAS et al., 2016; SOUKUP et al., 2017). As folhas e caules da videira e bagaço de uva representam uma biomassa ideal para obter compostos fenólicos (MANCA et al., 2016; EFTEKHARI et al., 2017). Os compostos bioativos presentes nos subprodutos de origem vegetal contribuem para seu potencial uso em aplicações tecnológicas (BALASUNDRAM et al., 2006). Atualmente, esforços têm sido direcionados para a obtenção de extratos bioativos de matrizes naturais utilizando diversas técnicas de extração (GOULA et al., 2016; HAAS et al., 2016; BAJOUB et al., 2017). Além da técnica de extração, a eficiência da extração é afetada por diversos fatores, dentre os quais o tipo de solvente tem sido considerado o mais importantes (DORTA et al., 2012). Esses fatores combinados são essenciais para explorar as matrizes residuais, pois a importância científica e industrial dos materiais vegetais é reforçada por sua caracterização química e possíveis aplicações.

Há um interesse crescente das vinícolas na reutilização ou nas aplicações de subprodutos da uva, visando reduzir o desperdício de processamento e os impactos ambientais. Os subprodutos da uva são representados principalmente por bagaço de uva e seus constituintes ricos em polifenóis, como sementes e cascas, estes têm encontrado aplicações valiosas em muitas áreas de pesquisa e segmentos farmacêuticos. Na produção do suco de uva, o processamento é focado na manutenção da qualidade do suco e o acúmulo de matrizes não

utilizáveis cresce com o aumento da produção de suco de uva clarificado, contribuindo para o maior descarte de resíduos sólidos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi obter o enriquecimento de polifenóis do resíduo de uva obtido a partir da centrifugação do suco de uva tinta por meio da otimização de técnicas extrativistas e otimização da extração de antocianinas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Reagentes

Os padrões analíticos de compostos fenólicos foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA) e da Fluka (Steinheim, Alemanha). Os reagentes ácido 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico), 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo e Folin-Ciocalteu foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). A acetona, etanol, ácido acético, metanol, vanilina, cloreto férrico, cloreto de potássio e acetato de sódio foram adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). O metanol e acetonitrila de grau cromatográfico foram obtidos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil).

2.2 Amostras

Os resíduos de uvas foram doados por uma vinícola localizada em São Marcos, Rio Grande do Sul. As amostras de resíduo de uva foram coletadas após a etapa de centrifugação do suco de uva, esta etapa contribui para a clarificação do suco. A centrifugação foi realizada a 100 rcf (g) por 10 min em centrífuga decanter Peralisi com capacidade de processamento de 9000 L de suco por hora (Jesi, Itália). As amostras foram obtidas a partir do processamento das uvas Bordô e Isabel (V.

*labrusca*L.) e foram mantidos a -18 °C. As amostras foram congeladas em ultracongelamento (UFV 37 Terroni, Brasil) a -80 °C e liofilizadas (liofilizador de bancada, Terroni, Brasil) por 24 horas até atingir umidade relativa de 5% (p/p). As amostras foram tamisadas em peneira de 20 mesh (0,9 mm) e armazenadas a -20 °C até o momento das análises (HAAS et al., 2016).

2.3 Extração dos compostos fenólicos

Em experimentos preliminares, três métodos de extração foram avaliados para a extração de compostos fenólicos utilizando solução hidroalcoólica de metanol (80% v/v) como solvente. Os métodos de extração utilizados foram o ultrassom (Ultrasonic cleaner, USC 1400[®], 40 kHz), agitador orbital (KMC-1300V[®]) e agitador de placa (B. Brain Biotech International, CERTOMAT[®]MO, Melsungen, Alemanha). O tempo de extração foi estabelecido em 5, 30 e 120 min para o método de agitação orbital, ultrassom e agitação em placa, respectivamente. Os parâmetros de massa de amostra, volume de solvente e relação solvente:água foram mantidos constantes para as extrações. Após a definição do método de agitação, os seguintes solventes foram avaliados para a preparação dos extratos: metanol (80% v/v), acetona (80% v/v) e etanol (80% v/v), as condições de extração mantiveram-se constantes. Para verificar a eficiência de cada método de extração, as amostras foram contaminadas com compostos fenólicos (15 mg L⁻¹) e os polifenóis individuais foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência.

2.4 Delineamento experimental

A extração de antocianinas do resíduo de uva foi realizada utilizando um planejamento fatorial completo de três níveis (3^3) contendo três pontos centrais. O tempo de extração (X_1), concentração de solvente (X_2) e razão sólido-líquido (X_3) foram as variáveis independentes, e seus níveis codificados foram apresentados na Tabela 1. Os níveis de variáveis independentes foram baseados nos resultados preliminares.

O delineamento experimental foi construído com 3 repetições do ponto central para estimar o erro experimental, levando a 18 experimentos realizados em ordem aleatória. As extrações foram realizadas utilizando como solvente o metanol e o método de extração de agitação orbital, conforme seleccionado nos ensaios preliminares (Item 2.3). A resposta observada (y) foi a soma da área do pico das antocianinas individuais obtidas a partir da análise cromatográfica. Para estimar a resposta, um modelo empírico composto de um polinômio de segunda ordem foi construído (Eq. 1), onde y é a resposta prevista, β_0 é a constante do modelo, β_i é o coeficiente do efeito linear, β_{ii} é o coeficiente do efeito quadrático, β_{ij} é o coeficiente de interação entre os fatores i e j , x_{ij} e x_j são as variáveis codificadas independentes, ε é o erro, k é o número de variáveis, e i e j são os fatores codificados do modelo.

Equação 1:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j>i}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon$$

Tabela 1. Matriz codificada de planejamento fatorial completo de três níveis contendo três pontos centrais.

Experimentos	Variáveis codificadas			Respostas (Soma da área do pico)
	X_1	X_2	X_3	
1	0,00	0,00	-1,68	18607052
2	0,00	1,68	0,00	8467890
3	0,00	0,00	1,68	4426419,5
4	-1,00	1,00	1,00	7456778
5	-1,00	-1,00	-1,00	10358918
6	1,00	-1,00	1,00	6917837
7	1,00	-1,00	-1,00	14745955
8	0,00	-1,68	0,00	6278919
9	0,00	0,00	0,00	7736032
10	-1,00	-1,00	1,00	6908674
11	1,68	0,00	0,00	7433014
12	0,00	0,00	0,00	7958921,5
13	1,00	1,00	1,00	7056778
14	1,00	1,00	-1,00	15051594,5
15	0,00	0,00	0,00	7798132,5
16	-1,68	0,00	0,00	7879014,5
17	0,00	0,00	0,00	7912031
18	-1,00	1,0	-1,00	15280726

2.5 Determinação dos compostos fenólicos e atividade antioxidante

Os extratos foram preparados segundo Jara-Palacios et al. (2014); Drosou et al. (2015) com modificações. A otimização do processo de extração contribuiu para a escolha das melhores condições para a extração dos compostos fenólicos. O método de extração e o

solvente foram determinados de acordo com o Item 2.4. A razão de amostra de 1:10 (p/v) e solução hidroalcoólica de metanol:água (85:15 v/v) foram utilizadas para as extrações. O procedimento foi realizado sob agitação mecânica por agitador orbital durante 5 min em temperatura ambiente de 25 °C. As amostras foram centrifugadas (Janetzki, K24) a 1000 rcf (g) por 10 min e os sobrenadantes foram coletados para análise.

A análise de polifenóis totais (PT) foi determinada de acordo com Singleton e Rossi (1965) e as antocianinas monoméricas totais (AMT) foram determinadas de acordo com Giusti e Wrolstad (2001). Os resultados de PT e AMT foram expressos em mg kg^{-1} . A capacidade antioxidante ($\text{TEAC } \mu\text{mol g}^{-1}$) das amostras foi determinada pelos métodos ABTS (Re et al., 1999) e DPPH (Kim et al., 2002). Todas as análises foram realizadas em espectrofotômetroem triplicata (n=3) (Hitachi U 2010, CA, EUA).

2.6 Determinação de compostos fenólicos individuais por HPLC

A determinação da composição fenólica individual do resíduo de uva foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando um cromatógrafo líquido da Shimadzu (Kyoto, Jap) (HPLC-DAD). Os compostos fenólicos foram quantificados de acordo com o método desenvolvido por Burin et al. (2014) com modificações. Na análise dos compostos hidroxicinâmicos o gradiente de eluição foi: 0-30% de solvente B durante 35 min, 30-60% de solvente B durante 5 min, 60% de solvente B durante 2 min, 60-0% de solvente B durante 18 min. Na análise dos compostos hidroxibenzóicos, o gradiente de eluição

foi: 0–80% de solvente B durante 55 min, 80–100% de solvente B durante 15 min e 100–0% de solvente B durante 5 min. A quantificação das antocianinas foi realizada de acordo com Revilla et al. (1999). A separação foi realizada utilizando o programa de eluição gradiente, 35–95% de solvente B durante 20 min, 95–100% de solvente B durante 5 min, 100–35% de solvente B durante 5 min. As curvas analíticas foram construídas em matriz.

2.7 Análise estatística

A análise de variância (ANOVA), teste de Tukey ($p < 0,05$), análise de correlação e análise de superfície de resposta foram realizadas utilizando o software STATISTICA versão 6.0 (2001) (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). Todas as análises foram realizadas em triplicatas e os resultados expressos como média \pm desvio padrão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito dos métodos de extração na composição fenólica do resíduo de uva

Diferentes classes de polifenóis foram extraídas do resíduo de uva utilizando os métodos de agitação em placa, ultrassom e agitação orbital (Figura 1). A etapa de otimização é muito importante para aumentar a eficiência da extração. Em nossos experimentos, a eficiência da extração foi avaliada em termos de sinal do analito, como obtido nos ensaios cromatográficos. Os métodos de extração foram avaliados pela comparação da área dos analitos utilizando a análise de variância

(ANOVA). É possível observar diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os métodos, particularmente para a extração dos flavonóides catequina e epicatequina, ácidos fenólicos, ácido ferúlico, caféico, cafeico, estilbeno e *trans*-resveratrol. Assim, com as condições de extração mantidas constantes, o método de agitação mecânica influenciou seletivamente a composição fenólica do resíduo de uva.

As concentrações de polifenóis foram maiores nos extratos obtidos por agitação em placa ou orbital quando comparados com o método de ultrassom (Figura 1). Estudos demonstraram que o uso de baixas frequências (18–40 kHz) em extrações com ultrassom podem promover a ruptura da parede celular e facilitar o acesso do solvente ao conteúdo celular, aumentando assim a área superficial e a taxa de transferência de massa (CRAVOTTO et al., 2008; SHIRSATH et al., 2012). Neste estudo a extração de polifenóis utilizando o método de ultrassom e solvente hidroalcoólico não apresentou alta eficiência na extração da maioria dos compostos fenólicos, principalmente flavanóis e ácidos hidroxicinâmicos.

Em relação aos métodos de agitação orbital e placa, foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) para a extração da maioria dos compostos fenólicos, com exceção do ácido gálico, epicatequina, miricetina e quercetina. O agitador orbital utiliza velocidade de rotação de até 1000 rcf (g), enquanto o agitador de placa utiliza 1 rcf (g). O tempo de extração foi fixado em 5 e 120 min para o método de agitação orbital e agitação em placa, respectivamente. Os resultados sugerem que o tempo de extração e a velocidade de rotação podem favorecer a extração de compostos fenólicos. De fato, a agitação facilita a mistura e a uniformidade, permitindo maior interação entre o

solvente e a amostra (KUMAR et al., 2017). A extração pode ser explicada pela lei de difusão de Fick que prevê um equilíbrio final entre as concentrações de soluto na matriz sólida e na solução de massa após determinado tempo de extração (SILVA et al., 2007). Em estudos anteriores com uvas, uma alta eficiência na extração de polifenóis foi associada ao método de agitação orbital (BURIN et al., 2014).

Em relação ao tempo de extração, o uso de tempos prolongados pode acelerar a degradação de compostos fenólicos, além de ser trabalhoso e demorado (CARRERA et al., 2012). Portanto, a fim de minimizar as alterações na composição fenólica, reduzir os custos de energia e desenvolver um método simples e viável aplicável em análises de rotina, o métodos de agitação orbital foi selecionado para a otimização da extração de polifenóis do resíduo de uva.

Após definir o método de extração, foi avaliado o efeito de diferentes solventes na extração dos compostos fenólicos individuais (Figura 2). Três soluções hidroalcoólicas (80% v/v) foram utilizadas para as extrações, o metanol, o etanol e a acetona, a seleção dos solventes foi baseada em sua polaridade. A extração de fitoquímicos de materiais vegetais está intimamente relacionada à polaridade do solvente.

Os compostos fenólicos das classes de flavanóis, ácidos hidroxicinâmicos, ácidos hidroxibenzóicos, antocianinas e flavonóis foram detectados em todos os extratos de resíduo de uva obtido com os solventes hidroalcoólicos. A eficiência da extração variou significativamente entre os compostos fenólicos e o tipo de solvente. O agitador orbital foi utilizado para a extração de compostos fenólicos e os parâmetros utilizados foram: razão solvente:água de 80:20% (v/v),

relação sólido:solvente de 1:20 (p/v) e tempo de 5 min. As análises cromatográficas mostraram as maiores concentrações de compostos fenólicos individuais nos extratos metanólicos. Isto corrobora que o metanol foi o solvente mais eficiente para a extração da maioria dos polifenóis do resíduo de uva. De fato, estes resultados podem estar relacionados à polaridade e boa permeabilidade do metanol, além da alta solubilidade de compostos fenólicos neste solvente (SIDDHURAJU; BECKER, 2003).

O metanol foi eficiente na extração do *trans*-resveratrol (Figura 2 A). No entanto, os níveis de ácido ferúlico, peonidina-3-*O*-glicosídeo e ácido siríngico foram significativamente menores em extratos metanólicos em comparação com os extratos obtidos com outros solventes. A extração por solvente é a técnica mais utilizada para o isolamento de compostos fenólicos de matrizes naturais (Moure et al., 2001). Segundo Bazykina et al. (2002), o etanol extrai eficientemente os flavonóides e seus glicosídeos, catecol e taninos enquanto os ácidos fenólicos e as catequinas são mais eficientemente extraídos com metanol. A acetona é o solvente mais eficiente para a extração de polifenóis de alto peso molecular, como os taninos condensados (MOKRANI; MADANI, 2016; TAN et al., 2013).

Considerando que os polifenóis são formados por uma variedade de moléculas de diferentes polaridades, procuramos maximizar a extração fenólica misturando o solvente orgânico com água. A mistura de solvente com água é considerada mais eficiente que os monossolventes na extração de compostos fitoquímicos (SPIGNO; DE FAVERI, 2007). Segundo Vatai et al. (2009), a eficiência da extração dos compostos fenólicos é menor quando se utiliza solventes

puros. Segundo alguns autores, a adição de água a solventes orgânicos contribui com o aumento da polaridade e facilita a extração dos compostos fenólicos (SPIGNO; DE FAVERI, 2007).

A extração de fitoquímicos como os compostos fenólicos é diretamente influenciada pelo solvente de extração, sendo necessário quantificar as diferentes classes de polifenóis para escolher o solvente mais eficiente. Em geral, quanto maior a massa molar do solvente, menor é a sua polaridade, permitindo que outras substâncias com aproximadamente o mesmo peso molecular sejam facilmente extraídas (BOEING et al., 2014). Como observado na Figura 2, não houve um único solvente capaz de extrair simultaneamente todas as classes de polifenóis do resíduo de uva. Estes resultados indicam que a seleção do solvente deve ser feita de acordo com a classe de compostos de interesse.

Figura 1. Extração dos compostos fenólicos do resíduo de uva utilizando diferentes métodos de extração: agitador de placa (120 min), ultrassom (30 min) e agitador orbital (5 min). (A) Flavanóis, ácidos hidroxicinâmicos, flavonóis e estilbeno; (B) ácidos hidroxibenzóicos. Condições fixas: massa de amostra (0,25 g), proporção solvente:água 80:20 (v/v) e volume (5 mL). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (n=3). Grupos homogêneos de acordo com o teste de comparação múltipla de Tukey, com nível de confiança de 95%. Letras diferentes para o mesmo composto indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

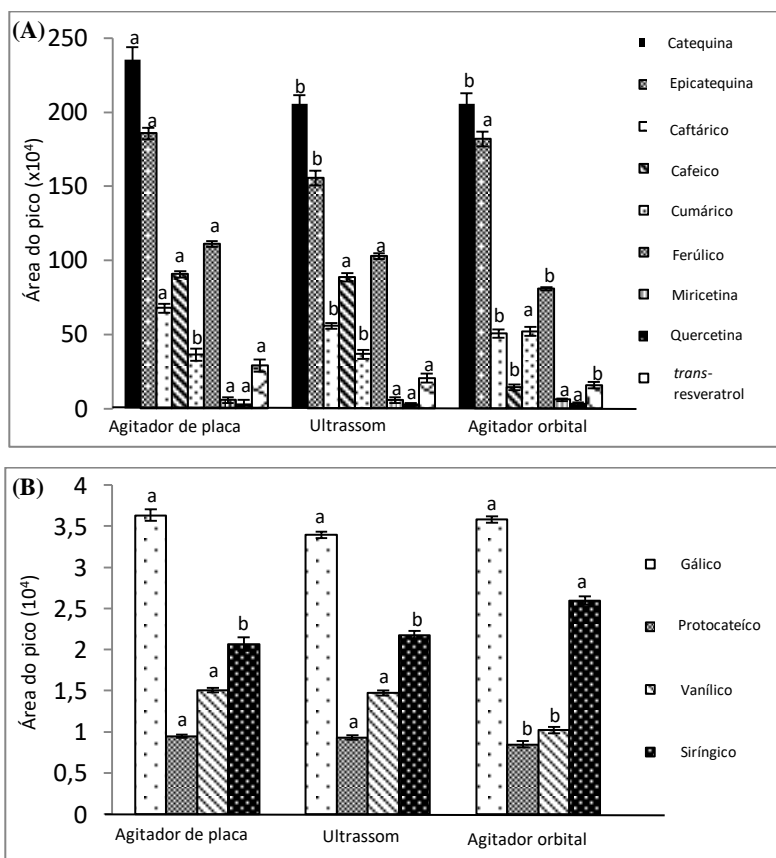


Figura 2. Extração dos compostos fenólicos do resíduo de uva utilizando soluções hidroalcoólicas de metanol, etanol e acetona como solventes de extração. (A) Flavanóis, ácidos hidroxicinâmicos, flavonóis e estilbeno. (B) ácidos hidroxibenzoicos. (C) antocianinas. Condições fixas: agitador orbital (5 min), massa de amostra (0,25 g), proporção solvente:água 80:20 (v/v) e volume (5 mL). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (n=3). Grupos homogêneos de acordo com o teste de comparação múltipla de Tukey, com nível de confiança de 95%. Letras diferentes para o mesmo composto indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

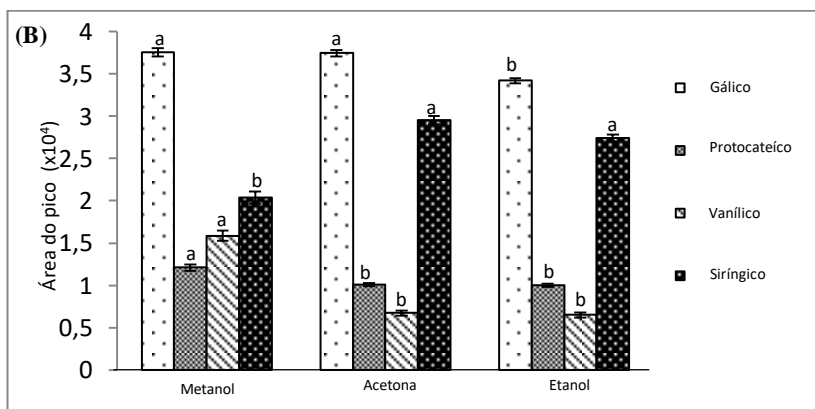
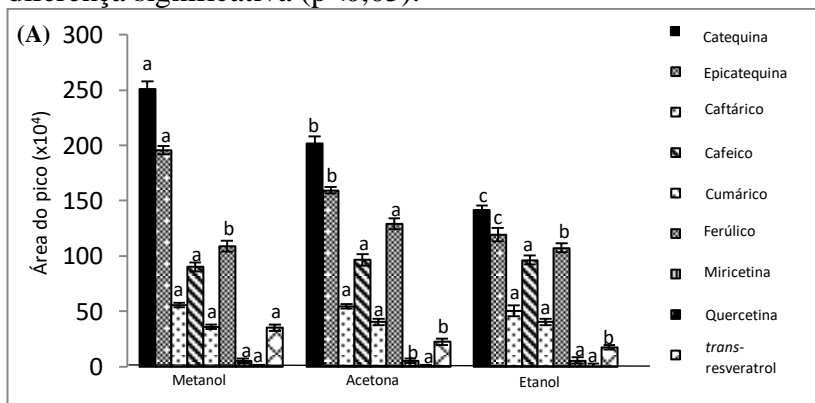
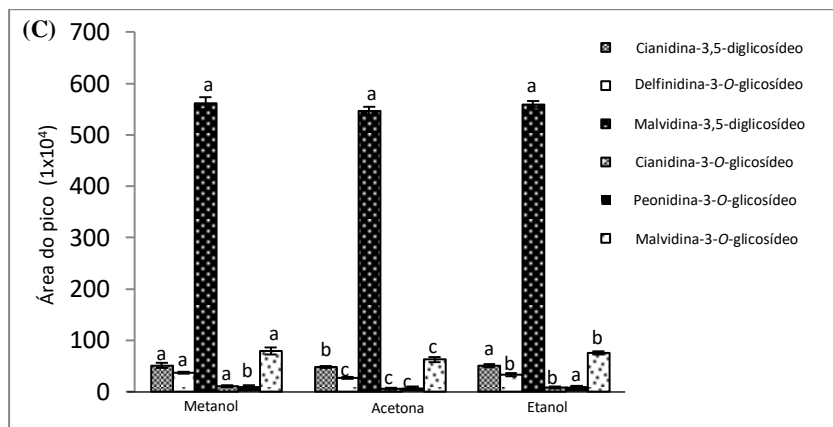


Figura 2. (continuação).

3.2 Otimização da extração de polifenóis individuais

O método de extração representa uma etapa fundamental para a caracterização química e utilização industrial do resíduo de uva. A condição de extração selecionada foi o metanol a 80% (v/v) como solvente de extração e o método de agitação orbital, sendo utilizada no delineamento experimental. O planejamento fatorial completo contendo três pontos centrais foi utilizado com o objetivo de definir os melhores parâmetros para a extração de antocianinas individuais, os principais polifenóis encontrados no resíduo de uva, bem como os de maior interesse em aplicações tecnológicas (BOX et al., 2005). De fato, as antocianinas têm grande importância para a indústria alimentícia e farmacêutica, houve o aumento da sua utilização como corante natural, o que pode estar relacionado às suas propriedades bioativas, bem como sua coloração e solubilidade em água (CHUNG et al., 2016; MAHDAVI et al., 2016).

A significância dos fatores foi confirmada pela análise de variância (ANOVA), onde foi possível observar que todos os fatores avaliados (relação sólido:solvente (p/v), tempo de extração (min) e concentração de solvente (%)) os efeitos quadráticos foram significativos ($p < 0,05$) (Tabela 2). Curiosamente, a relação solvente:amostra e concentração de solvente apresentaram efeito mais significativo do que o tempo de extração.

Tabela 2. Análise de variância da superfície de resposta da extração de antocianinas individuais do resíduo de uva.

	Soma quadrática (SS)	DF	MS	<i>F</i> -valor	<i>p</i> -valor
Tempo (L)	5,16	1	5,16	384,92	0,000289
Tempo (Q)	2,30	1	2,30	171,47	0,000962
Concentração de solvente (L)	6,62	1	6,62	4932,95	0,000006
Concentração de solvente (Q)	2,23	1	2,24	16,70	0,026480
Razão sólido:líquido (Q)	2,48	1	2,48	18537,77	0,000001
Razão sólido:líquido (L)	5,67	1	5,67	30453,88	0,000004
Erro	4,02	3	1,34		
Total SS	2,54	17			

DF, graus de liberdade; MS, Quadrado médio; L, efeito linear; Q, efeito quadrático.

Os resultados demonstram que o modelo foi significativo ($F = 38,57$ e $p < 0,05$) e a falta de ajuste não foi significativa ($p > 0,05$), indicando que o modelo quadrático foi válido para este estudo. Além

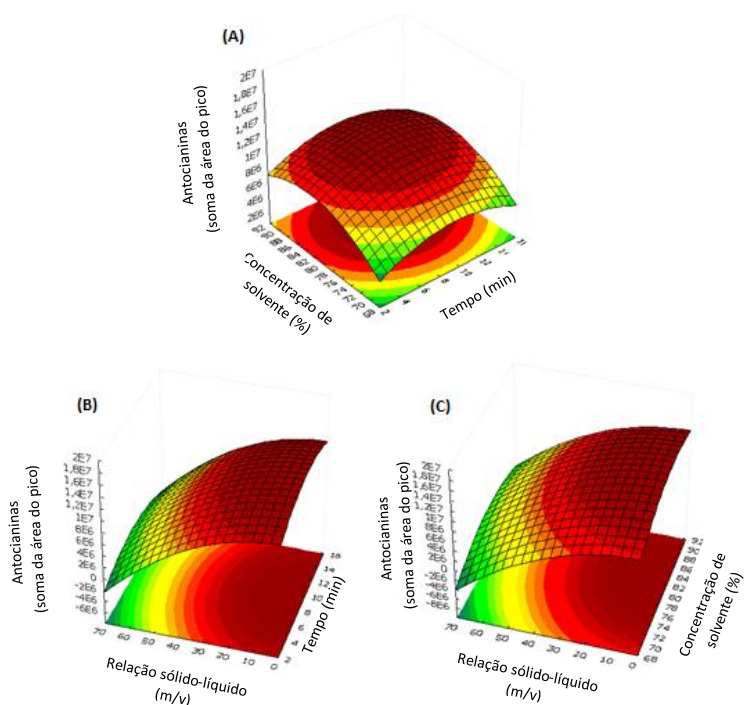
disso, os valores de R^2 predito e R^2 ajustado (0,8705 e 0,9452, respectivamente) confirmaram este resultado. Para a representação gráfica foram utilizados gráficos para descrever os efeitos individuais e cumulativos das variáveis avaliadas e seu efeito sobre a resposta. A superfície de resposta do gráfico tridimensional para o modelo de regressão ajustado aos dados é representada na Figura 3. A resposta máxima foi obtida com relação sólido:líquido 1:10 (p/v), tempo de extração de 5 min e concentração de solvente de 85%, que representam as melhores condições para a extração otimizada de antocianinas utilizando o método de agitação orbital.

Os resultados da otimização utilizando o resíduo de uva indicam que a proporção de solvente/amostra deve ser de 10 a 20 (v/p), a concentração de solvente de 75 a 90% (v/v) e o tempo de extração de 5 a 14 min para a extração ideal de antocianinas. Ao utilizar baixas proporções de solvente:amostra foi possível obter maiores concentrações de antocianinas. Sabe-se que os efeitos de diferentes variáveis, como tipo de solvente e relação solvente:água, tempo de extração e razão amostra:solvente afetam o rendimento da extração e a composição fitoquímica (DAI; MUMPER, 2010). Em estudo realizado por Medouni-Adrar et al. (2015) com cascas e sementes de uva, a concentração de polifenóis totais aumentou quando a proporção de solvente/amostra reduziu. A extração de compostos fenólicos é maior quando é utilizado maior volume de solvente, o que está relacionado aos princípios da transferência de massa (PINELO et al., 2005). Em relação aos princípios de transferência de massa, a taxa de difusão é diretamente proporcional ao gradiente de concentração que aumenta com menor relação sólido:líquido. O aumento da razão amostra:solvente fornece um

maior coeficiente de difusão (CACACE; MAZZA, 2003), e a mudança no coeficiente de atividade devido à composição do solvente afeta a solubilidade dos compostos (FRANK; DOWNEY; GUPTA, 1999).

Em estudo de Corrales et al. (2009), o contato do solvente com as cascas de uva por mais tempo promoveu maior difusão dos compostos, como as antocianinas. Revilla e González-Sanjose (1998) avaliaram a extração de compostos fenólicos de uvas Cabernet Sauvignon sob diferentes condições, e observaram que o maior tempo de extração proporciona uma maior quantidade de antocianinas extraídas. No entanto, no presente estudo, observou-se que não houve grande aumento na concentração de antocianinas com o aumento do tempo, mesmo com este fator sendo significativo. A liofilização do resíduo de uva proporcionou uma estrutura mais porosa à amostra, facilitando assim a extração dos compostos fenólicos (HAAS et al., 2017). Portanto, as características microestruturais do resíduo de uva tornaram o tempo um fator menos relevante para a extração de antocianinas. De fato, a estrutura de alimentos processados ou matrizes vegetais afetam a disponibilidade de compostos bioativos, assim como suas propriedades e funcionalidade (AGUILERA, 2005).

Figura 3. Gráficos de superfície de resposta para avaliar o efeito da concentração de solvente, tempo e razão sólido-líquido na extração de antocianinas individuais (soma das áreas de pico) (A) Concentração de solvente (%) vs Tempo (min). (B) Relação sólido-líquido vs Tempo (min). (C) Relação sólido-líquido (m/v) vs concentração de solvente (%).



3.3 Perfil bioativo e atividade antioxidante do resíduo de uva

O perfil fenólico do resíduo de uva de duas variedades de uvas *V. labrusca* L., Bordô e Isabel foram identificadas quanto as diferenças químicas. O resíduo de uva Bordô e Isabel apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) para todas as classes de compostos fenólicos

avaliados. O perfil fenólico do resíduo de uva Isabel e Bordô está apresentado na Tabela 3. A concentração de polifenóis totais na amostra Bordô e Isabel foi de 14910,34 e 6381,60 mg kg⁻¹, respectivamente, a amostra Bordô apresentou concentração 57,2% maior de polifenóis totais. A variedade de uva Bordô possui maior concentração de antocianinas que outras variedades de uvas *V. labrusca*. Este fato contribui para o uso desta variedade em blends de sucos com coloração menos intensa, por exemplo, o suco de uva produzido com a variedade Isabel (RIZZON; MENEGUZZO, 2007).

O resíduo de uva Bordô apresentou alta atividade antioxidante, o que está associado ao potencial bioativo das matrizes naturais. A atividade antioxidante do resíduo de uva foi comparável à dos sucos produzidos a partir da mesma variedade de uvas (TOALDO et al., 2015). Correlações positivas ($p < 0,05$) foram encontradas entre a atividade antioxidante (método ABTS), polifenóis totais e antocianinas monoméricas totais. A atividade antioxidante (ABTS e DPPH) apresentou alta correlação com polifenóis totais ($r = 0,98$ e $r = 0,96$) e antocianinas monoméricas totais ($r = 0,97$ e $r = 0,95$), corroborando que diferentes classes de polifenóis estão relacionadas à atividade antioxidante de matrizes vegetais. Em um estudo de Tournour et al. (2015), uma correlação significativa foi obtida entre polifenóis totais e o método de DPPH ($r = 0,94$).

O resíduo de uva Bordô apresentou as maiores concentrações para a maioria dos compostos fenólicos quando comparadas à variedade Isabel, com exceção do ácido vanílico e quercetina. Em relação aos ácidos hidroxibenzóicos, todos os compostos variaram significativamente ($p < 0,05$) entre as amostras. O ácido gálico foi

detectado em maior concentração na amostra Bordô (8,05 mg kg⁻¹), enquanto as concentrações de ácido vanílico foram maiores na amostra Isabel (10,20 mg kg⁻¹).

Todos os ácidos hidroxicinâmicos apresentaram diferença significativa entre as amostras avaliadas, sendo que o ácido cafeico e ferúlico estavam presentes em maiores concentrações na amostra Bordô. De acordo com a literatura, os ácidos hidroxicinâmicos exibem maior atividade antioxidante em comparação com os ácidos hidroxibenzóicos (Andreasen et al., 2001). A atividade antioxidante apresentou alta correlação com o ácido cafeico e ferúlico ($r = 0,99$).

A catequina e epicatequina foram quantificadas em altas concentrações nos resíduos de uva Bordô e Isabel. A concentração de catequina e epicatequina foi de 745,36 e 680,14 mg kg⁻¹ e 662,05 e 298,46 mg kg⁻¹, respectivamente. Estes compostos mostraram alta correlação com a atividade antioxidante, catequina ($r = 0,98$) e epicatequina ($r = 0,99$). O efeito bioativo desses compostos foi relatado em alguns estudos com vinhos, onde a catequina demonstrou efeito contra os radicais livres e atividade quelante (Modun et al., 2008), enquanto a epicatequina mostrou propriedades vasodilatadoras (PADILLA et al., 2005).

Entre os flavonóis, a miricetina e a quercetina foram os principais compostos quantificados nas amostras, enquanto o campferol não foi detectado no resíduo de uva. Este grupo de polifenóis é amplamente encontrado em matrizes naturais. A ligação dupla entre C-2 e C-3, conjugada ao grupo 4-oxo no anel C, aumenta a capacidade de eliminação de radicais destes compostos. A substituição dos grupos hidroxila no anel B pelos grupos metoxi altera o potencial redox e pode

afetar a capacidade de eliminação de radicais dos flavonóis (Pietta, 2000). Uma alta correlação foi observada entre a miricetina e a atividade antioxidante ($r = 0,98$).

O *trans*-resveratrol é um polifenol bioativo da família dos estilbenos, e apresenta altas concentrações nos resíduos de uva Bordô (143,17 mg kg⁻¹) e Isabel (83,45 mg kg⁻¹), sendo fortemente correlacionado com o antioxidante atividade ($r = 0,99$). Isto demonstra que os resíduos de uva são uma fonte potencial de *trans*-resveratrol, o que aumenta a importância do uso deste material residual como fonte alternativa de fitoquímicos. Estudos demonstraram que o *trans*-resveratrol é um potente antioxidante, com propriedades anti-inflamatórias, antiproliferativas e cardioprotetoras (AZIZ et al., 2003; DVORAKOVA; LANDA, 2017).

O perfil de antocianinas dos resíduos de uva Bordô e Isabel foi identificado na análise cromatográfica (Figura 4). O resíduo de uva Bordô apresentou altas concentrações de antocianinas. A malvidina-3,5-diglicosídeo (1226,26 mg kg⁻¹) e cianidina 3,5-diglicosídeo (165,79 mg kg⁻¹) foram encontradas em maiores concentrações, característica das variedades *Vitis labrusca* L. (NATIVIDADE et al., 2013). Em estudo de Lago-Vanzela et al. (2011) com uva Bordô, a concentração de malvidina-3,5-diglicosídeo (1359 mg kg⁻¹) foi semelhante a deste estudo. Foram observadas diferentes concentrações de antocianinas para o resíduo de uva Isabel, este apresentada predominantemente malvidina-3-*O*-glicosídeo (293,28 mg kg⁻¹) e peonidina-3-*O*-glicosídeo (110,27 mg kg⁻¹), já a cianidina-3,5-diglicosídeo não foi detectada. A alta concentração de antocianinas no resíduo de uva está de acordo com Boulton (2001) que afirma que as antocianinas permanecem

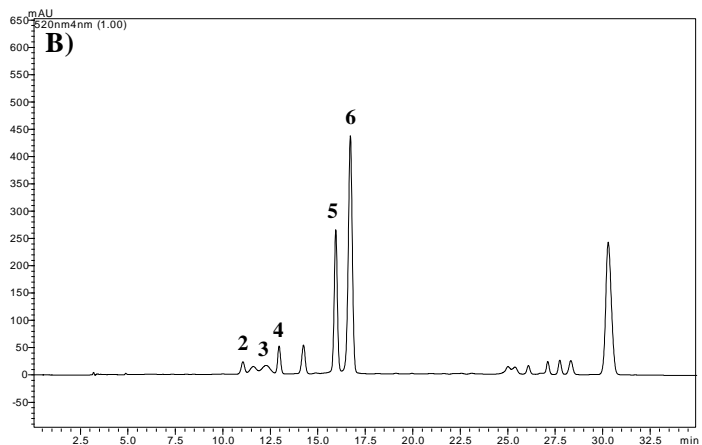
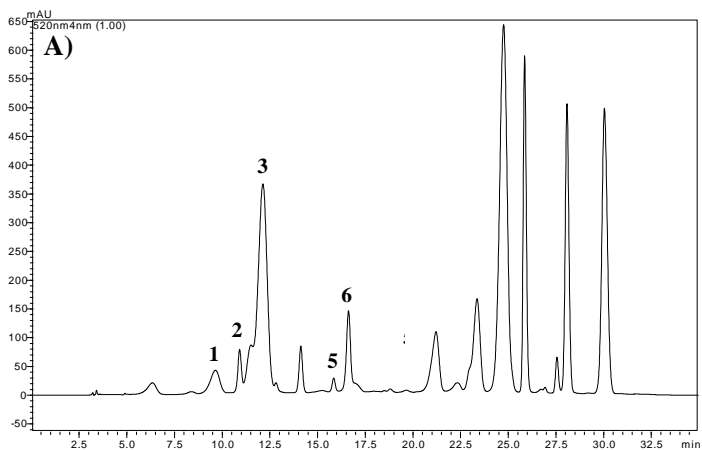
principalmente em resíduos derivados do processamento da uva. Estudos com antocianinas específicas da uva, bem como seus efeitos em associação com outros compostos fenólicos, têm sido pouco estudados para aplicações terapêuticas. Portanto, novos estudos sobre o potencial bioativo das antocianinas presentes nesses resíduos são sugeridos.

Tabela 3. Composição fenólica do resíduo de uva da variedade Bordô e Isabel.

Compostos fenólicos (mg kg⁻¹)	Bordô	Isabel
<i>Ácidos fenólicos</i>		
Gálico	8,05 ^a ±0,09	2,48 ^b ±0,17
Protocateíco	3,15 ^a ±0,06	2,49 ^b ±0,01
Vanílico	2,39 ^b ±0,01	10,20 ^a ±0,01
Siríntrico	3,10 ^a ±0,13	2,24 ^b ±0,13
Elágico	<0,02*	<0,02*
Cafeico	69,77 ^a ±0,04	44,99 ^b ±0,12
<i>Trans</i> -caftárico	34,66 ^a ± 2,34	21,24 ^b ±0,22
<i>p</i> -Cumárico	15,20 ^a ±0,03	5,94 ^b ±0,08
Ferúlico	145,56 ^a ±0,38	30,78 ^b ±0,03
<i>Flavonóis</i>		
Campferol	<0,04*	<0,04*
Quercetina	4,14 ^a ±0,10	6,14 ^b ±0,22
Miricetina	15,59 ^a ± 0,58	5,37 ^b ± 0,14
<i>Flavanóis</i>		
(+)-Catequina	745,36 ^a ± 4,06	680,14 ^b ±1,53
(-)-Epicatequina	662,05 ^a ± 2,34	298,46 ^b ±3,17
<i>Trans</i> -resveratrol	143,17 ^a ±0,20	83,45 ^b ±0,73
Tirosol	<0,15*	<0,15*
<i>Antocianinas</i>		
Cianidina-3,5-diglicosídeo	165,79±9,51	nd
Cianidina-3-O-glicosídeo	5,20 ^b ±0,09	14,41 ^a ±0,13
Malvidina-3,5-diglicosídeo	1226,26 ^a ± 8,02	58,52 ^b ±1,91
Malvidina-3-O-glicosídeo	78,06 ^b ± 2,05	293,28 ^a ±1,08
Peonidina-3-O-glicosídeo	8,69 ^b ±0,96	110,27 ^a ±0,03
Polifenóis totais	14910,34 ^a ±2,50	6381,60 ^b ±2,90
Antocianinas monométicas totais	8080,68 ^a ±3,45	1497,18 ^b ±2,89
<i>Atividade antioxidante (TEAC μmol g⁻¹)</i>		
ABTS	54,81 ^a ±0,02	38,78 ^b ±0,80
DPPH	38,62 ^a ±0,29	19,63 ^b ±0,03

Resultados expressos como média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras. nd = não detectado. * LOD: limite de detecção.

Figura 4. Cromatogramas de antocianinas dos resíduos de uva (A) Bordô; (B) Isabel. 1: cianidina-3,5-diglicosídeo; 2: delphinidina-3-*O*-glicosídeo; 3: malvidina-3,5-diglicosídeo; 4: cianidina-3-*O*-glicosídeo; 5: peonidina-3-*O*-glicosídeo; 6: malvidina-3-*O*-glicosídeo. TR (A/B) = 9.639/nd; TR (A/B) = 10.908/11.053; TR (A/B) = 12.128/12.272; TR (A/B) = 12.816/12.959; TR (A/B) = 15.842/15.941; TR = (A/B) = 16.619/16.708. TR = tempo de retenção.



4. CONCLUSÃO

Entre os parâmetros avaliados para a otimização do processo de extração, a agitação mecânica orbital apresentou maior eficiência na extração de compostos fenólicos individuais. Os parâmetros otimizados melhoraram a extração hidroalcoólica sólido-líquido dos polifenóis e permitiram a caracterização do resíduo de uva. O perfil bioativo dos resíduos de uvas Isabel e Bordô indicou diferenças na composição fenólica, tais como flavanóis, antocianinas, flavonóis e ácidos fenólicos, o que pode direcionar as aplicações tecnológicas e funcionais. As abordagens extrativistas propostas neste trabalho fornecem subsídios para a reutilização desse resíduo vegetal como alternativa viável para o desenvolvimento de produtos de qualidade com alto valor agregado.

REFERÊNCIAS

- AGUILERA, J.M. Why food microstructure? **Journal of Food Engineering**, v. 67, p. 3-11, 2005.
- ANDREASEN, M.F.; LANDBO, A.K.; CHRISTENSEN, L.P.; HANSEN, A.; MEYER, A.S. Antioxidant effects of phenolic rye (*Secale cereale* L.) extracts, monomeric hydroxycinnamates, and ferulic acid dehydromers on human low-density lipoproteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4090–4096, 2001.
- AZIZ, M.H.; KUMAR, R.; AHMAD, N. Cancer chemoprevention by resveratrol: *in vitro* and *in vivo* studies and the underlying mechanisms. **International Journal of Oncology**, v. 23, p. 17–28, 2003.
- BAJOUB, A.; MEDINA-RODRÍGUEZ, S.; GÓMEZ-ROMERO, M.; AMINE AJAL, E.A.; BAGUR-GONZÁLEZ, M.G.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A.; CARRASCO-PANCORBO, A. Assessing the varietal origin of extra-virgin olive oil using liquid chromatography fingerprints of phenolic compound, data fusion and chemometrics. **Food Chemistry**, v. 215, p. 245–255, 2017.
- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, p.191-203, 2006.
- BOULTON, R.B. The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 52, p. 67-87, 2001.
- BURIN, V.M.; FERREIRA-LIMA, N.E.; PANCERI, C.P.; BORDIGNON-LUIZ, M.T. Bioactive compounds and antioxidant activity of *Vitis vinifera* and *Vitis labrusca* grapes: Evaluation of different extraction methods. **Microchemical Journal**, v. 114, p. 155-163, 2014.
- CACACE, J.E.; MAZZA, G. Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. **Journal of Food Engineering**, v. 59, p. 379–389, 2003.

CARRERA, C.; RUIZ-RODRÍGUEZ, C.; PALMA, M.; BARROSO, C.G. Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes. **Analytica Chimica Acta**, v. 32, p. 100–104, 2012.

CHUNG, C.; ROJANASASITHARA, T.; MUTILANGI, W.; MCCLEMENTS, D.J. Stabilization of natural colors and nutraceuticals: Inhibition of anthocyanin degradation in model beverages using polyphenols. **Food Chemistry**, v. 212, p. 596–603, 2016.

CORRALES, M.; GARCÍA, A.F.; BUTZ, P.; TAUSCHER, B. Extraction of anthocyanins from grape skins assisted by high hydrostatic pressure. **Journal of Food Engineering**, v. 90, p. 415–421, 2009.

CRAVOTTO, G.; BOFFA, L.; MANTEGNA, S.; PEREGO, P.; AVOGADRO, M.; CINTAS, P. Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 15, p. 898–902, 2008.

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

DORTA, E.; LOBO, M.G.; GONZALEZ, M. Reutilization of mango by-products: study of the effect of extraction solvent and temperature on their antioxidant properties, **Journal of Food Science**, v. 77, p. 80–88, 2012.

DROSOU, C.; KYRIAKOPOULOU, K.; BIMPILAS, A.; TSIMOGIANNIS, D.; KROKIDA, M. A comparative study on different extraction techniques to recover red grape pomace polyphenols from vinification byproducts. **Industrial Crops and Products**, v. 75, p. 141–149, 2015.

DVORAKOVA, M.; LANDA, P. Anti-inflammatory activity of natural stilbenoids: A review. **Pharmacological Research**, v. 124, p. 126–145, 2017.

FRANK, T.C.; DOWNEY, J.R.; GUPTA, S.K. Quickly screen solvent for organic solids. **Chemical Engineering and Processing**, v. 95, p. 41–61, 1999.

GIUSTI, M.M.; WROLSTAD, R.E. **Anthocyanins: characterization and measurement with UV-visible spectroscopy**. In: Wrolstad, RE (ed) *Current protocols in food analytical chemistry*, 1st edn. Wiley, New York, F1.2.1–F1.2.13, 2001.

GOULA, A.M.; THYMIATIS, K.; KADERIDES, K. Valorization of grape pomace: Drying behavior and ultrasound extraction of phenolics. **Food and Bioproducts Processing**, v. 100, p. 132-144, 2016.

HAAS, I.C.S.; TOALDO, I.M.; DE GOIS, J.S.; BORGES, D.L.G.; PETKOWICZ, C.L.O.; BORDIGNON-LUIZ, M.T. Phytochemicals, Monosaccharides and Elemental Composition of the Non-Pomace Constituent of Organic and Conventional Grape Juices (*Vitis labrusca* L.): Effect of Drying on the Bioactive Content. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 71, p. 422-428, 2016.

HAAS, I.C.S.; TOALDO, I.M.; MULLER, C.M.O.; BORDIGNON-LUIZ, M.T. Modeling of drying kinetics of the non-pomace residue of red grape (*V. labrusca* L.) juices: Effect on the microstructure and bioactive anthocyanins. **Journal of Food Process Engineering**, 00:e12568, 2017.

JARA-PALACIOS, M.J.; HERNANZ, D.; GONZÁLEZ-MANZANO, S.; SANTOS-BUELGA, C.; ESCUDERO-GILETE, M.L.; HEREDIA, F.J. Detailed phenolic composition of white grape by-products by RRLC/MS and measurement of the antioxidant activity. **Talanta**, v. 125, p. 51-57, 2014.

KIM, Y.K.; GUO, Q.; PACKER, L. Free radical scavenging activity of red ginsengaqueous extracts. **Toxicology**, v. 172, p. 149–156, 2002.

KUMAR, S.; AHIRWAR, R.; REHMAN, I.; NAHAR, P. Moderate reagent mixing on an orbital shaker reduces the incubation time of enzyme-linked immunosorbent assay. **Analytical Biochemistry**, v. 528, p. 53–56, 2017.

LAGO-VANZELA, E.S.; DA-SILVA, R.; GOMES, E.; GARCÍA-ROMERO, E.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. Phenolic composition of the edible parts (flesh and skin) of Bordo grape (*Vitis labrusca*) using HPLCDADESI-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 13136–13146, 2011.

- MEDOUNI-ADRAR, S.; BOULEKBACHE-MAKHLOUF, L.; CADOT, Y.; MEDOUNI-HAROUNE, L.; DAHMOUNE, F.; MAKHOUKHE, A.; MADANI, K. Optimization of the recovery of phenolic compounds from Algerian grape by-products. **Industrial Crops and Products**, v. 77, p. 123–132, 2015.
- MAHDAVI, S.A.; JAFARI, S.M.; ASSADPOUR, E.; GHORBANI, M. Storage stability of encapsulated barberry's anthocyanin and its application in jelly formulation. **Journal of Food Engineering**, v. 181, p. 59-66, 2016.
- MODUN, D.; MUSIC, I.; VUKOVIC, J.; BRIZIC, I.; KATALINIC, V.; OBAD, A.; PALADA, I.; DUJIC, Z.; BOBAN, M. The increase in human plasma antioxidant capacity after red wine consumption is due to both plasma urate and wine polyphenols. **Atherosclerosis**, v. 197, p. 250–256, 2008.
- MOURE, A.; CRUZ, Y.; FRANCO, D.; DOMINGUES, J.; SINEIRO, Y. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, v. 72, p. 145-171, 2001.
- MOKRANI, A.; MADANI, K. Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of peach (*Prunus persica* L.) fruit. **Separation and Purification Technology**, v. 162, p. 68–76, 2016.
- NATIVIDADE, M.M.P.; CORRÊA, L.C.; SOUZA, S.V.C.; PEREIRA, G.E.; LIMA, L.C.O. Simultaneous analysis of 25 phenolic compounds in grape juice for HPLC: Method validation and characterization of São Francisco Valley samples. **Microchemical Journal**, v. 110, p. 665–674, 2013.
- PADILLA, E.; RUIZ, E.; REDONDO, S.; GORDILLO-MOSCOSO, A.; SLOWING, K.; TEJERINA, T. Relationship between vasodilation capacity and phenolic content of Spanish wines. **European Journal of Pharmacology**, v. 517, p. 84–89, 2005.
- PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035-1042, 2000.

PINELO, M.; RUBILAR, M.; JEREZ, M.; SINEIRO, J.; NÚÑEZ, M.J. Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 2111–2117, 2005.

REICHARDT, C. **Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry**, 3rd ed., WileyVCH, 2003.

REVILLA, I.; GONZÁLEZ-SANJOSÉ, M.L. Methanol release during fermentation of red grapes treated with pectolytic enzymes. **Food Chemistry**, v. 63, p. 307-312, 1998.

REVILLA, I.; PÉREZ-MAGARIÑO, S.; GONZÁLEZ-SANJOSÉ, M.L.; BELTRÁN, S. Identification of anthocyanin derivatives in grape skin extracts and red wines by liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 847, p. 83-90, 1999.

RIZZON, L.A.; MENEGUZZO, J. **Grape Juice. Embrapa Technological Information**, Brasília, 2007.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGEMNTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 1231–1237, 1999.

SIDDHURAJU, P.; BECKER, K. Antioxidant properties of various extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* L.) leaves. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 2144-2155, 2003.

SILVA, E.; ROGEZ, H.; LARONDELLE, Y. Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. **Separation and Purification Technology**, v. 55, p. 381–387, 2007.

SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A. Colourimetry of total phenolics with phosphomolybdc-phosphotungstic acid reagent. **American journal of enology and viticulture**, v. 16, p. 144–158, 1965.

SHIRSATH, S.R.; SONAWANE, S.H.; GOGATE, P.R. Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations. A review of current status. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 53, p. 10–23, 2012.

SPANGHERO, M.; SALEM, A.; ROBINSON, P.H. Chemical composition, including secondary metabolites, and rumen fermentability of seeds and pulp of Californian (USA) and Italian grape pomaces. **Animal Feed Science and Technology**, v. 152, p. 243–255, 2009.

SPIGNO, G.; DE FAVERI, D.M. Antioxidants from grape stalks and marc: Influence of extraction procedure on yield, purity and antioxidant power of the extracts. **Journal of Food Engineering**, v. 78, p. 793–801, 2007.

TAN, M.C.; TAN, C.P.; HO, C.W. Effects of extraction solvent system, time and temperature on total phenolic content of henna (*Lawsonia inermis*) stems. **International Food Research Journal**, v. 20, p. 3117–3123, 2013.

TOALDO, I.M.; CRUZ, F.A.; ALVES, T.L.; GOIS, J.S.; BORGES, D.L.G.; CUNHA, H.P.; SILVA, E.L.; BORDIGNON-LUIZ, M.T. Bioactive potential of *Vitis labrusca* L. grape juices from the Southern Region of Brazil: Phenolic and elemental composition and effect on lipid peroxidation in healthy subjects. **Food Chemistry**, v. 173, p. 527–535, 2015.

VATAI, T.; SKERGET, M.; KNEZ, Z.; KARETH, S.; WEHOWSKI, M.; WEIDNER, E. Extraction and formulation of anthocyanin-concentrates from grape residues. **Journal of Food Engineering**, v. 90, p. 246–254, 2009.

VAUZOUR, D.; VAFEIADOU, K.; RENDEIRO, C.; CORONA, G.; SPENCER, J. P. E. The inhibitory effects of berry-derived flavonoids against neurodegenerative processes. **Journal of Berry Research**, v. 1, p. 45–52, 2010.

CAPITULO 3

PERFIL FENÓLICO, MACRO E MICROELEMENTOS EM FRAÇÕES BIOACESSÍVEIS DO RESÍDUO DE SUCO DE UVA USANDO SIMULAÇÃO GASTROINTESTINAL *IN VITRO*

Isabel Cristina da Silva Haas^a, Isabela Maia Toaldo^a, Trilícia Margarida Gomes^a, Aderval S. Luna^b, Jefferson Santos de Gois^b and Marilde T. Bordignon-Luiz^{a*}.

^aDepartamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Admar Gonzaga Rd. 1346, Itacorubi, 88034-001, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

^bPrograma de Graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual do Rio de Janeiro, Rua São Francisco Xavier 524, Maracanã, 20550-013, Rio de Janeiro, Brasil.

Nota: O texto e os dados discutidos neste capítulo foram reproduzidos ou adaptados da publicação de autoria de Isabel Cristina da Silva Haas, Isabela Maia Toaldo, Trilícia Margarida Gomes, Aderval S. Luna, Jefferson Santos De Gois e Marilde T. Bordignon Luiz, disponível em Food Bioscience, v. 27, p. 66-74. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.11.002>, reproduzido com permissão da Elsevier.

RESUMO

A uva e seus constituintes possuem grande quantidade de minerais essenciais e polifenóis. Estes nutrientes e as substâncias bioativas proporcionam benefício à saúde, no entanto depende do nível de ingestão e bioacessibilidade. A concentração de compostos fenólicos individuais, macro e microelementos do resíduo de uva obtido do processamento do suco de uva da variedade Isabel e Bordô foram investigados utilizando a digestão *in vitro* e determinados por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos e espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente. Durante a digestão, mudanças importantes foram observadas nas concentrações de polifenóis e minerais após a passagem pela fase gástrica e intestinal. Os compostos bioativos como o *trans*-resveratrol, catequina e epicatequina foram altamente bioacessíveis após a digestão do resíduo de uva Bordô. Houve redução significativa na concentração de polifenóis e minerais no final da fase intestinal. O resíduo de uva de ambas as variedades apresentaram maior atividade antioxidante na fase gástrica, o que foi relacionado à alta concentração de polifenóis. As antocianinas identificadas em maiores concentrações nas amostras de resíduos incluem a malvidina-3-*O*-glicosídeo e malvidina-3,5-diglicosídeo, sendo 7% e 60% bioacessíveis, respectivamente. Os elementos, Ca, Mg, Cu, Fe, Sr, Mn, Zn, Al, Ni e Pb não foram detectados na última fase de digestão, sendo pouco bioacessíveis. Os índices de bioacessibilidade encontrados para o resíduo de uva são consistentes com as propriedades bioativas dos produtos da uva.

Palavras-chave: Suco de uva. Polifenóis. Minerais. Digestão *in vitro*. Bioacessibilidade. Potencial Bioativo.

ABSTRACT

Grape and grape constituents have high amounts of essential minerals and polyphenols. Health benefits of these nutrients and other bioactive substances depend on their level of intake and bioaccessibility. The behavior and levels of individual phenolic compounds, macro- and microelements of the grape juice sediment that was removed from red grape juices of Bordo and Isabel varieties were investigated using an *in vitro* digestion and determined using high performance liquid chromatography-diode array detection and inductively coupled plasma optical emission spectrometry. During digestion, important changes were observed in concentrations of polyphenols and minerals upon passage through the gastric and enteric phases. Bioactive compounds such as *trans*-resveratrol, catechin and epicatechin were highly bioaccessible from the Bordo sample. A significant decrease in levels of polyphenolics and minerals was observed at the end of the intestinal phase. The grape juice sediment of both varieties showed higher antioxidant capacity in the gastric phase, which was related to the high concentration of polyphenols. The anthocyanins identified at higher concentrations in samples included malvidin-3-*O*-glucoside and malvidin-3,5-diglucoside that were 7 and 60% bioaccessible, respectively. The elements Ca, Mg, Cu, Fe, Sr, Mn, Zn, Al, Ni and Pb were not detected at the last phase of digestion, being poorly bioaccessible. The bioaccessibility indexes found for this grape juice sediment are consistent with the bioactive properties of grape products.

Keywords: Grape juice. Polyphenols. Minerals. *In vitro* digestion. Bioaccessibility. Bioactive potential.

1. INTRODUÇÃO

A uva (*Vitis* sp.) e os derivados da uva são fontes importantes de minerais e polifenóis com propriedades bioativas (GIOVINAZZO; GRIECO, 2015; HAAS et al., 2016). A principal razão para o interesse nos polifenóis são suas propriedades antioxidantes e sua atuação na prevenção de doenças associadas ao estresse oxidativo, como câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (PANDEY; RIZVI, 2009). Na dieta de um indivíduo saudável, a ingestão média de polifenóis é de até 1.700 mg por dia. Durante a ingestão de alimentos estimasse que os flavonóides correspondem a aproximadamente 52% da ingestãototal de polifenóis, enquanto a ingestão de ácidos fenólicoscorresponde a aproximadamente 46% da ingestão total, outros polifenóis, como os estilbenos e tirosol, representam proporções menores na dieta (GROSSO et al., 2014).

O resíduo de uva é obtido após a centrifugação do suco durante a etapa de clarificação, que remove cerca de 4-8% dos sólidos suspensos. É um material altamente colorido e úmido que contém sólidos suspensos, monossacarídeos, fibras solúveis e insolúveis, minerais e polifenóis. Os polifenóis mais abundantes nesta matriz são catequina, epicatequina e *trans*- resveratrol, assim como glicosídeos de antocianinas, principalmente os glicosídeos de malvidina (HAAS et al., 2018). Alguns minerais essenciais também são encontrados, tais como Ca, K e Fe. A remoção do resíduo de uva é uma etapa opcional no processamento de sucos e contribui para a clarificação e a qualidade do suco (HAAS et al., 2016).

O uso de derivados de uva na indústria alimentícia e farmacêutica aumentou com o crescente interesse em constituintes de uva como fonte de compostos bioativos com propriedades relacionadas à saúde (HAAS et al., 2018; TAGLIAZUCCHI et al., 2010). Estudos têm investigado a digestão, a absorção intestinal e o metabolismo de polifenóis e nutrientes, o que pode elucidar diferentes perspectivas sobre sua bioatividade (ATTRI et al., 2017; CILLA et al., 2009). A identificação e caracterização destes constituintes em matrizes vegetais fornecem informações sobre a composição química, principalmente com foco na sua qualidade nutricional. Estudos sobre matrizes alimentares, composição de nutrientes ou fitoquímicos, absorção e modificações gastrointestinais de moléculas químicas fornecem as informações básicas necessárias para determinar a biodisponibilidade e a atividade biológica das substâncias bioativas (MANACH et al., 2005; PANDEY; RIZVI, 2009).

A simulação gastrointestinal *in vitro* é uma ferramenta valiosa para investigar o efeito da digestão sobre a bioacessibilidade de polifenóis e minerais, obtendo dados essenciais para apoiar afirmações de relevância biológica para a saúde humana. A bioacessibilidade pode ser definida como a fração de um composto ou espécie que é liberada da matriz para o trato gastrointestinal e, assim, torna-se disponível para a absorção intestinal (CARDOSO et al., 2015). Este parâmetro contribui para avaliar a qualidade nutricional de um nutriente ou composto bioativo, incentivando o desenvolvimento de alimentos funcionais (FERNÁNDEZ-GARCÍA; CARVAJAL-LÉRIDA; PÉREZ-GÁLVEZ, 2009). Os alimentos funcionais são definidos como alimentos que apresentam efeito benéfico para a saúde, mas não a

nutrição básica, acredita-se que estes alimentos promovem a saúde ideal, reduzindo o risco de doenças. Para o alimento ser considerado funcional, ele deve ser avaliado usando estudos *in vivo* e *in vitro* para elucidar os efeitos benéficos nas funções-alvo do corpo, além das suas propriedades nutricionais. Alimentos funcionais oferecem benefícios para a saúde e bem-estar do indivíduo, bem como a redução de doenças cardiovasculares, câncer e osteoporose (BROWN et al., 2018; DIPLOCK et al., 1999).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Reagentes

Os padrões de compostos fenólicos (ácidos hidroxibenzóicos, ácidos hidroxicinâmicos, flavanois, flavonóis e antocianinas), Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), DPPH[•] (1,1 difenil-2-picrilhidrazil) e ABTS^{•+} [ácido 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico)] foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA). O ácido clorídrico, ácido nítrico, peróxido de hidrogênio e hidróxido de sódio foram adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). As enzimas α -amilase, pepsina, pancreatina e sais biliares (hidrato de taurocolato de sódio, glicooxicolato de sódio e o hidrato de taurodesoxicolato de sódio) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). As soluções padrões certificadas (1000 mg/L) de cada elemento (Al, Ca, Cu, Fe, Mn, Ni, K, Sr, Pb, Rb e Zn) foram obtidas da Spex Certiprep Chemical (Metuchen, Nova Jersey, EUA) e foram usadas para preparar as curvas de calibração analíticas. A água

ultrapura foi obtida de um sistema de água Milli-Q Plus (Millipore, Bedford, Massachusetts, EUA).

2.2 Amostras

Para a elaboração dos sucos de uva foram utilizadas uvas das variedades Bordô e Isabel (*V. labrusca* L.). As uvas foram colhidas com maturidade técnica, com leituras de sólidos solúveis totais de 15-17 °Brix, e os sucos de uva foram processados separadamente usando um processo contínuo de escala industrial. Os resíduos de uvas foram obtidos a partir da centrifugação dos sucos ao longo do processamento. As bagas de uva foram inicialmente trituradas usando um triturador mecânico (EDA, São Paulo, Brasil). O mosto de uva (casca, polpa e sementes) foi utilizado para a extração do suco em um tanque de aço inoxidável de 10.000 L com temperatura controlada (85 ± 1 °C, 10 s). Após duas horas de extração, o bagaço da uva foi removido por prensagem mecânica (EDA, São Paulo, Brasil) para separar as partes sólidas (casca e sementes) do suco. O suco de uva foi então bombeado para a centrífuga decanter 600 Peralisi (Jesi, Ancona, Itália) para separação do resíduo de uva. A centrifugação foi realizada a 3300 g por 10 min utilizando a capacidade total de 9000 L de suco/h. As amostras foram coletadas no compartimento inferior da centrífuga e armazenadas a -18 °C. A desidratação da amostra foi realizada em liofilizador (Haas et al., 2016). As amostras foram congeladas a -80 °C utilizando ultracongelador UFV 37 (Terroni Fauvel, São Carlos, SP) e liofilizadas com liofilizador Terroni Fauvel LT por 24 horas até atingir umidade relativa de 5% (p/p). As amostras liofilizadas foram trituradas,

tamizadas (20 mesh) e armazenadas a -20°C por no máximo 3 semanas.

2.3 Simulação gastrointestinal *in vitro*

A simulação gastrointestinal *in vitro* foi realizada conforme descrito por Minekus et al. (2014). A digestão *in vitro* consiste de três fases, a fase oral, gástrica e intestinal. As amostras controle foram denominadas de controle do resíduo de uva Bordô (CSB) e controle do resíduo de uva Isabel (CSI). As amostras controle foram utilizadas para a digestão *in vitro* sem a presença das enzimas α -amilase, pepsina, pancreatina e sais biliares.

Para a fase oral, 0,25 g de resíduo de uva, fluído salivar (pH 7,0) e enzima α -amilase (75 U/mL) foram agitados (100 g) por 2 min a 37°C . As amostras foram submetidas à fase gástrica para a sequência de digestão. Nesta fase, o fluído gástrico (pH 3,0), pepsina (2000 U/mL) e CaCl_2 (0,075 mol/L) foram adicionados à mistura oral e mantidos em banho termostático por 2 horas a 37°C . Após a digestão gástrica, as amostras foram submetidas a fase intestinal, onde ocorre a adição do fluído intestinal, pancreatina (800 U/mL), sais biliares (10 mol/L) e CaCl_2 (0,3 mol/L), com o pH ajustado para 7,0 com NaOH 1 M. A fase intestinal foi incubada durante mais 2 h em banho termostático a 37°C . No final de cada fase de digestão, o sobrenadante foi recolhido, centrifugado a 2480 g durante 10 min (Gently, Clifton, New Jersey, EUA) e denominado como amostra digerida (fração bioacessível). O pH da fase oral, gástrica e intestinal foi ajustado para 3,0 para permitir a análise cromatográfica. O resíduo de uva digerido foi recolhido no final da digestão e foi extraído com metanol:água 85:15 (v/v) para

determinar a composição que não foi bioacessível. A amostra foi agitada em Vortex (Vision Scientific, Bucheon, Gyeonggi-do, Coreia do Sul) por 5 min e centrifugada a 2480 g por 10 min. O sobrenadante foi então coletado e evaporado em um evaporador rotativo com temperatura controlada (29 ± 1 °C) (HAAS et al., 2018). Todos os procedimentos foram realizados em triplicata.

2.4 Bioacessibilidade dos compostos fenólicos e capacidade antioxidante das frações bioacessíveis

O efeito da digestão *in vitro* sobre a composição fenólica e a capacidade antioxidante do resíduo de uva foi avaliado pelo índice de bioacessibilidade calculado pela Eq. (1) (ORTEGA et al., 2011).

$$BI(\%) = 100 \cdot \frac{A}{B} (1)$$

Sendo A a concentração de cada composto fenólico no final da fase intestinal (Granado-Lorencio et al., 2008), e B a concentração de cada composto fenólico antes da digestão *in vitro* do resíduo de uva. A capacidade antioxidante do resíduo de uva foi determinada utilizando os ensaios de eliminação de radicais livres ABTS^{•+} e DPPH[•] como descrito por Re et al. (1999) e Kim, Guo e Packer (2002), respectivamente. As amostras foram diluídas em soluções pela taxa de decaimento da absorbância a 754 e 517 nm para os radicais ABTS e DPPH após 6 e 30 min de reação, respectivamente. Os resultados foram expressos como equivalentes de Trolox ($\mu\text{mol/g}$). As análises

espectrofotométricas foram realizadas em um espectrofotômetro Hitachi UV-Vis (Kyoto, Japão).

2.5 Determinação dos compostos fenólicos individuais por HPLC

Os compostos fenólicos (ácidos hidroxibenzóicos, flavan-3-ols, ácidos hidroxicinâmicos, flavonóis e antocianinas) foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de arranjo de diodos (HPLC-DAD) utilizando um cromatógrafo líquido Shimadzu (Kyoto, Japão) equipado com desgaseificador a vácuo (DGU-14A), bomba quaternária LC-10AT, detector DAD (SPDM20A) e software LCsolution (CBM-20A). A separação analítica foi realizada em coluna de fase reversa C18 (4,6 × 250 mm, 5 µm) da Shimadzu.

Os compostos fenólicos foram quantificados pelo método desenvolvido por Burin, Ferreira-Lima, Panceri e Bordignon-Luiz (2014) com modificações. Para a análise de ácidos hidroxibenzóicos (ácidos gálico, protocateíco, vanílico, siríngico e elágico) utilizou-se um programa de eluição por gradiente onde a fase móvel foi constituída por água ultrapura:ácido acético (98:2 v/v) (A) e acetonitrila:solvente A (80:20 v/v) (B). A eluição dos compostos foi realizada na forma de gradiente: 0 a 80% de solvente B durante 55 min, 80 a 100% de solvente B durante 15 min e 100 a 0% de solvente B durante 5 min. A taxa de fluxo utilizada foi de 1,0 mL/min, com detecção ajustada a 280 nm para todos os compostos. Para a quantificação de flavan-3-óis, ácidos hidroxicinâmicos e flavonóis, a fase móvel binária consistiu de água ultrapura:ácido acético (98:2 v/v) (A) e água ultrapura:ácido acético:acetonitrila (58:2:40 v/v/v) (B). As condições de eluição do

gradiente foram: 0–30% de solvente B durante 35 min, 30–60% de solvente B durante 5 min, 60% de solvente B durante 2 min, 60–0% de solvente B durante 18 min. A taxa de fluxo foi de 0,9 mL/min e a detecção foi fixada em 280 nm para catequina, epicatequina e tirosol, 320 nm para cafeico, *trans*-caftárico, *para*-cumárico e ferúlico, 306 nm para o *trans*-resveratrol e 360 nm para o campferol, quercetina e miricetina.

A quantificação de antocianinas, malvidina-3-*O*-glicosídeo, cianidina-3-*O*-glicosídeo, delphinidina-3-*O*-glicosídeo, peonidina-3-*O*-glicosídeo, malvidina-3,5-diglicosídeo e cianidina-3,5-diglicosídeo foi realizada utilizando o método de Revilla, Pérez-Magariño, González-Sanjosé e Beltrán (1999). A fase móvel consistiu de água ultrapura:ácido fórmico (90:10 v/v) (A) e água ultrapura:metanol:ácido fórmico (45:45:10 v/v/v) (B). A eluição dos compostos foi realizada na forma de gradiente: 35–95% de solvente B durante 20 min, 95–100% de solvente B durante 5 min, 100–35% de solvente B durante 5 min. A taxa de fluxo foi de 0,8 mL/min e a detecção foi realizada a 520 nm. As soluções padrões de cada composto fenólico foi utilizada para a construção das curvas de calibração e para a comparação das áreas de pico dos analitos com seus respectivos padrões. Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

2.6 Determinação multielementar por ICP OES

A composição elementar do resíduo de uva e suas frações bioacessíveis foram determinadas utilizando espectrômetro de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES), modelo iCAP 6300 DUO equipado com nebulizador concêntrico tipo Meinhard e uma

câmara de nebulização e amostrador automático CETAC modelo ASX-520 (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). A digestão da amostra foi realizada com ácido nítrico e peróxido de hidrogênio utilizando forno de microonda DGT-100 Plus Provecto (Provecto Analítica, São Paulo, Brasil). O argônio com 99,95% de pureza (Linde, Blumenau, Santa Catarina, Brasil) foi utilizado como gás principal, auxiliar e nebulizador. Os parâmetros operacionais foram 1300 W de energia de frequência de rádio, fluxo de gás nebulizador com taxa de 0,38 L/min e fluxo de gás auxiliar com taxa de 1,0 L/min. As análises foram realizadas em triplicata e os elementos determinados foram K, Sr, Ca, Mg, Cu, Fe, Mn, Zn, Al, Ni e Pb.

2.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software STATISTICA v. 6.0 (2001) (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, EUA). As análises de variância (ANOVA), teste de Tukey ($p \leq 0,05$), análise de correlação e análise de componentes principais foram utilizadas. Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos como média \pm desvio padrão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito da digestão *in vitro* sobre a composição fenólica e capacidade antioxidante do resíduo de uva

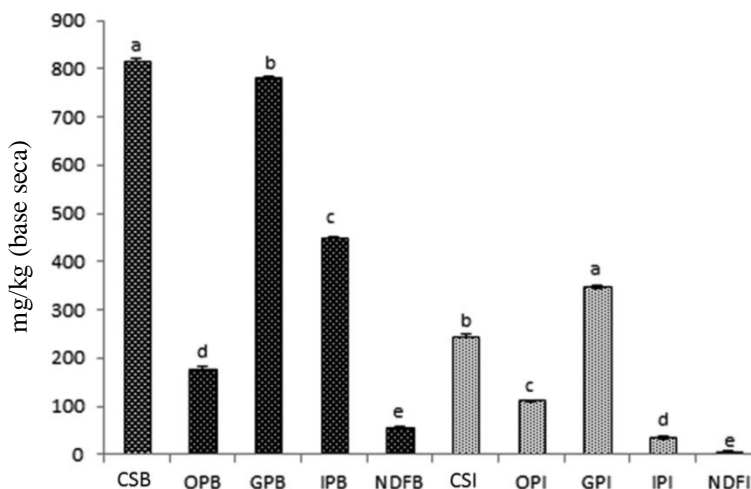
A composição fenólica e a capacidade antioxidante do resíduo de uva está apresentada na Tabela 1. Diversas classes de polifenóis

foram quantificadas nas frações digeridas e nas frações não digeridas. As concentrações de ácidos fenólicos, antocianinas, flavan-3-ols e a capacidade antioxidante variaram significativamente entre as amostras e suas frações digeridas. As concentrações da maioria dos compostos fenólicos e a capacidade antioxidante reduziram significativamente da fase gástrica para a fase intestinal. O tirosol e os flavonóis quercetina, miricetina e campferol não foram detectados nas amostras.

O resíduo de uva da variedade Bordô apresentou maior capacidade antioxidante que o resíduo de uva da variedade Isabel ao utilizar o ensaio ABTS. As frações bioacessíveis das amostras Bordô apresentaram maior capacidade antioxidante na fase gástrica que na fase intestinal, representando redução de 21%. O mesmo foi observado para a amostra Isabel, com redução de 43%. Ao avaliar a capacidade antioxidante utilizando o ensaio DPPH as amostras digeridas da variedade Isabel e Bordô apresentaram uma redução semelhante (33% para ambos os casos). As frações bioacessíveis apresentaram diferenças significativas em todas as fases da digestão (oral, gástrica e intestinal). As frações não digeridas apresentaram menor capacidade antioxidante que as digeridas, confirmando que a maioria dos compostos fenólicos foi extraída nas frações digeridas. Independentemente da variedade da uva, observou-se maior capacidade antioxidante na fase gástrica, o que está relacionado com as maiores concentrações de compostos fenólicos nesta fase. Alguns fatores como pH, meio gástrico e interações enzimáticas durante a digestão podem estar relacionados a este comportamento (BAKER; CHOCHAN; OPARA, 2013).

A soma dos polifenóis individuais após a digestão simulada está apresentada na Figura 1. A bioaccessibilidade foi calculada usando a Eq. (1). As menores concentrações de polifenóis foram observadas na fase oral para o resíduo de uva Bordô e Isabel. As frações não digeridas dos resíduos apresentaram baixas concentrações de polifenóis. Após a digestão simulada, os polifenóis totais do resíduo de uva Isabel e Bordô foram 14% e 55% bioacessíveis, respectivamente. Essa diferença pode ser explicada pelos polifenóis e pela composição dos resíduos de uva, devido às características varietais das uvas.

Figura 1. Soma dos compostos fenólicos individuais (mg/kg) do resíduo de uva após digestão gastrointestinal *in vitro*. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão. Para cada variedade, letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$). CSB: Controle do resíduo de uva Bordô, OPB: fase oral Bordô, GPB: fase gástrica Bordô, IPB: fase intestinal Bord, NDFB: fração não digerível Bordô, CSI: controle do resíduo de uva Isabel, OPI: fase oral Isabel, GPI: fase gástrica Isabel, IPI: fase intestinal Isabel, NDFI: fração não digerível Isabel.).



As concentrações de polifenóis nas frações digeridas apresentaram diferenças significativas entre as fases de digestão, o que pode ser indicativo da degradação ou alteração nas propriedades estruturais desses compostos durante a digestão. Em matrizes vegetais, os polifenóis estão na forma de ésteres, glicosídeos ou polímeros que não podem ser absorvidos em sua forma nativa, entretanto, agliconas e alguns glicosídeos podem ser absorvidos e metabolizados pelo sistema digestivo (MANACH et al., 2005). Estudos relatam que os polifenóis são mais estáveis em pH ácido (GULLON et al., 2015; TAGLIAZUCCHI et al., 2010), explicando assim o aumento da bioacessibilidade dos polifenóis na fase gástrica, enquanto o oposto foi observado na transição do ambiente gástrico para o intestinal. As concentrações de polifenóis após a digestão foram associadas à capacidade antioxidante da fração bioacessível. Estes compostos são provavelmente responsáveis pela capacidade antioxidante dos sucos e extratos de frutas (ATTRI et al., 2017; GIOVINAZZO; GRIECO, 2015; MANACH et al., 2005).

Tabela 1. (continuação)

	CSB	OPB	GPB	IPB	NDFB	CSI	OPI	GPI	IPI	NDFI
<i>Antocianinas</i>										
<i>Cianidina-3,5-diglicosídeo</i>	39 ^a ±1	nd	29 ^b ±1	15,0 ^c ±0,1	nd	nd	nd	Nd	nd	nd
<i>Cianidina-3-O-glicosídeo</i>	0,9 ^a ±0,1	nd	0,37 ^b ±0,0 3	0,30 ^b ±0,0 1	nd	1,2 ^b ±0,2	nd	2,2 ^a ±0,1	nd	nd
<i>Malvidina-3,5-diglicosídeo</i>	296 ^a ±4	73 ^d ± 2	257 ^b ±6	177 ^c ±1	22 ^e ±1	18 ^b ±1	8,2 ^c ± 0,6	20 ^a ±1	1,9 ^d ±0, 1	nd
<i>Malvidina-3-O-glicosídeo</i>	15 ^a ±1	8,1 ^d ± 0,9	13,3 ^b ±0,0 3	11 ^c ±1	2,1 ^e ±0,2	47 ^b ±2	25 ^c ± 1	65,0 ^a ±0,2	3,2 ^d ±0, 4	0,17 ^e ±0,0 1
<i>Peonidina-3-O-glicosídeo</i>	1,90 ^b ±0,04	2,7 ^a ± 0,3	1,60 ^b ±0,0 3	1,4 ^b ±0,1	0,2 ^c ±0,1	19 ^b ±1	9,6 ^c ±0,4	25,0 ^a ±0,2	1,7 ^d ±0, 2	nd
<i>Delfinidina-3-O-glicosídeo</i>	3,40 ^a ±0,03	1,1 ^b ± 0,2	nd	nd	nd	nd	nd	Nd	nd	nd
<i>Capacidade antioxidante (µmol/g)</i>	50 ^b ±1	8,7 ^d ±0,4	54 ^a ±1	42 ^c ±1	0,96 ^e ±0,06	19 ^b ±1	3,2 ^d ±0,3	34 ^a ±1	18 ^c ±1	0,45 ^e ±0,0 2
<i>ABTS^{•+}</i>	23 ^a ±1	12 ^c ±1	22 ^a ±1	15 ^b ±1	0,99 ^d ±0,08	6,3 ^b ±0,6	6,0 ^b ±0,5	8,6 ^a ±0,6	4,3 ^c ±0,5	0,40 ^d ±0,0 4
<i>DPPH•</i>										

Valores médios ± desvio padrão. Letras diferentes entre colunas indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre amostras digeridas da mesma variedade. nd: não detectado. CSB: Controle do resíduo de uva Bordô, OPB: fase oral Bordô, GPB: fase gástrica Bordô, IPB: fase intestinal Bordô, NDFB: fração não digerível Bordô, CSI: controle do resíduo de uva Isabel, OPI: fase oral Isabel, GPI: fase gástrica Isabel, IPI: fase intestinal Isabel, NDFI: fração não digerível Isabel.

3.2 Alterações nos níveis de compostos fenólicos individuais durante a digestão *in vitro*

Para avaliar a estabilidade dos compostos fenólicos dos resíduos de uvas e dos padrões durante a digestão simulada, os índices de bioacessibilidade foram calculados após a digestão e os resultados apresentados na Tabela 2. Informações sobre a bioacessibilidade de padrões fenólicos conforme relatado na literatura estão apresentadas. A matriz alimentar é um fator importante que influencia a bioacessibilidade de substâncias fenólicas, portanto, os dados não são comparáveis. Os índices de bioacessibilidade dos compostos fenólicos calculados apresentaram alta variabilidade, confirmando que a matriz pode afetar a estabilidade e o comportamento desses compostos durante a passagem gastrointestinal.

Após a digestão simulada das amostras, os compostos fenólicos foram identificados em concentrações mais baixas na fase oral, o que pode ser atribuído ao curto tempo de reação desta etapa. As concentrações de ácidos hidroxibenzoico e hidroxicinâmico aumentaram em 31% e 49% na fase gástrica (GPB e GPI) respectivamente, e reduziram em 27% e 35% na fase intestinal (IPB e IPI) quando comparadas à amostra controle. Estudos demonstram que a bioacessibilidade dos compostos fenólicos pode aumentar durante a digestão gástrica, enquanto a digestão intestinal promove reduções nas concentrações de diferentes tipos de polifenóis, o que provavelmente está relacionado à sua estabilidade, mudanças estruturais e degradação (BERMÚDEZ-SOTO et al., 2007; TAGLIAZUCCHI et al., 2010).

Tabela 2. Comportamento dos compostos fenólicos após digestão gastrointestinal do resíduo de uva e estabilidade de padrões comerciais relatados na literatura.

<i>Compostos fenólicos</i>	<i>Padrões</i>			<i>Referências</i>	<i>Amostras de resíduos de uvas</i>					
	<i>CGD</i>	<i>CID</i>	<i>BI</i>		<i>CGD (%)</i>		<i>CID (%)</i>		<i>BI (%)</i>	
	<i>(%)</i>	<i>(%)</i>	<i>(%)</i>		<i>Bordô</i>	<i>Isabel</i>	<i>Bordô</i>	<i>Isabel</i>	<i>Bordô</i>	<i>Isabel</i>
<i>Gálico</i>	5	43	-	Tagliazucchi et al. (2010)	28	56*	24	nd	76	nd
<i>Cafeico</i>	9* 0.1	54 25	46	Gayoso et al. (2016) Tagliazucchi et al. (2010)	25*	38	28	87	72	13
<i>Catequina</i>	3	58	42	Bermúdez-Soto et al. (2007)	3	35*	49	98	50	2
<i>Epicatequina</i>	nd	nd	-	Sanz-Buenhombre et al. (2016)	0.5*	97*	52	44	48	57
<i>trans-Resveratrol</i>	2*	70	-	Tagliazucchi et al. (2010)	33*	4*	21*	nd	121	nd
<i>Vanílico</i>	51	66	34	Sanz-Buenhombre et al. (2016)	113*	6*	24	29	76	71
<i>Caftárico</i>	-	-	-	-	22*	113*	32	35	68	65
<i>Ferúlico</i>	-	-	-	-	29*	13	32	49	68	51
<i>Soma de antocianinas individuais</i>	-	-	-	-	15	36*	42	92	58	8

*Concentração que aumentou em relação à amostra não digerida; BI: índice de bioacessibilidade. CGD: Variação da concentração após digestão gástrica em relação à amostra não digerida (%), CID: Variação da concentração após digestão intestinal em relação à amostra não digerida (%).

As concentrações de ácido gálico nas fases GPB e IPB foram semelhantes. Após a digestão da amostra Bordô, a concentração de ácido gálico reduziu 24% e foi 76% bioacessível. Os ácidos fenólicos de menor massa molar, como o ácido gálico, são rapidamente absorvidos pelo trato gastrointestinal, o que explica a alta bioacessibilidade deste composto (MANACH et al., 2005). Os resultados são consistentes com estudo de Tagliazucchi et al. (2010) que relatou uma redução de 43% nas concentrações de ácido gálico após a digestão gastrointestinal de uvas tintas. Outro composto hidroxibenzoico quantificado no resíduo de uva, o ácido vanílico apresentou uma concentração de 9,6 mg/kg na fase GPB e 3,4 mg/kg na fase IPB, a transição de fase reduziu a concentração em 64%. Para a amostra Isabel, a passagem da fase GPI para o IPI reduziu 33% da concentração. Apesar das diferenças nas concentrações de ácido vanílico entre as amostras varietais durante a simulação gastrointestinal a bioacessibilidade deste composto foi semelhante.

A concentração de ácido ferúlico reduziu 32% e 49% após a digestão do resíduo de uva Bordô e Isabel, sendo 68% e 51% bioacessíveis, respectivamente. As concentrações de ácido cafeico no resíduo de uva Bordô e Isabel reduziram 28% e 87% após a digestão, e a bioacessibilidade foi de 72% e 13%, respectivamente. Em estudo de Kamiloglu et al. (2016) com subprodutos de cenoura preta, alta estabilidade foi observada para o ácido ferúlico após digestão *in vitro*. Gayoso et al. (2016) ao avaliar o efeito do modelo de digestão na concentração de polifenóis observou que houve redução de 54% da concentração de ácido cafeico, e o índice de bioacessibilidade foi de 46%. A ocorrência generalizada de polifenóis nos alimentos, a estabilidade e, conseqüentemente a bioacessibilidade destes compostos

dependem das suas interações com a matriz, explicando assim as variações entre os diferentes alimentos à base de plantas, bem como entre as variedades de uvas avaliadas neste estudo.

O campferol, quercetina e miricetina não foram detectados no resíduo de uva em nenhuma fase da digestão. A concentração de catequina e epicatequina reduziu 49% e 52%, sendo 50% e 48% bioaccessíveis, respectivamente. A catequina ($r = 0,95$) e epicatequina ($r = 0,99$) apresentaram alta correlação com a capacidade antioxidante quando avaliada pelo método ABTS. Estes fenólicos apresentaram as maiores reduções em suas concentrações após a digestão do resíduo de uva Isabel e foram 2% e 57% bioaccessíveis, respectivamente. O *trans*-resveratrol apresentou alta estabilidade após a simulação gastrintestinal do resíduo de uva Bordô, e não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre GPB e IPB. Houve um aumento de 21% nas concentrações de *trans*-resveratrol e sua bioaccessibilidade foi de 121%. A alta bioaccessibilidade do *trans*-resveratrol sugere o potencial bioativo desta matriz, uma vez que este composto apresentou efeitos protetores contra o estresse oxidativo implicado em doenças crônicas (TOALDO et al., 2016).

Os cromatogramas de antocianinas do resíduo de uva durante a digestão simulada está apresentado na Figura 2. Durante a digestão do resíduo de uva Bordô, as concentrações de malvidina-3,5-diglicosídeo e cianidina-3,5-diglicosídeo na fase gástrica foram maiores que na fase intestinal. Após a passagem gastrointestinal, seus níveis reduziram em 49% e 31%, respectivamente. A malvidina-3,5-diglicosídeo foi 60% bioaccessível e apresentou alta correlação com a capacidade antioxidante avaliada pelo ensaio ABTS ($r = 0,98$). Após a digestão do resíduo de

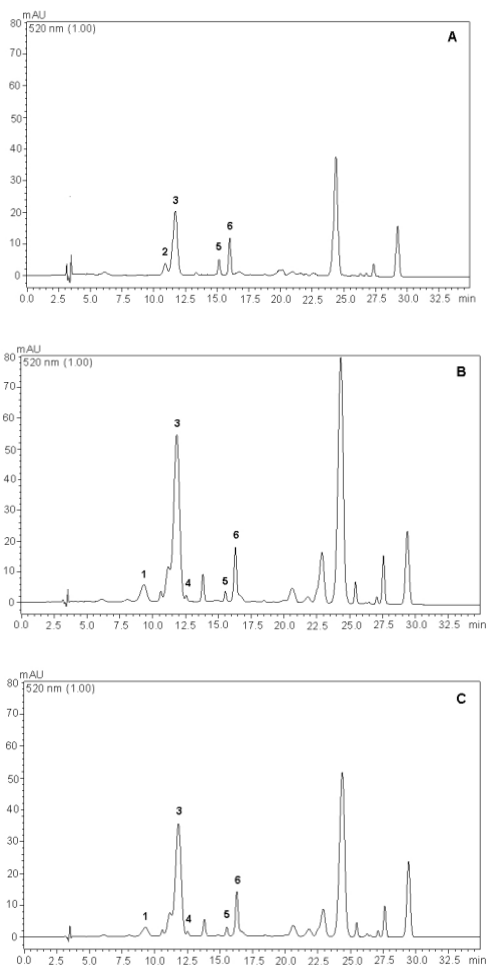
uva Isabel, a cianidina-3,5-diglicosídeo, cianidina-3-*O*-glicosídeo e delphinidina-3-*O*-glicosídeo não foram detectadas na fase intestinal (IPI). Todas as antocianinas quantificadas apresentaram reduções significativas ($p < 0,05$) nas concentrações na fase intestinal. A malvidina-3-*O*-glicosídeo foi encontrada em altas concentrações no resíduo de uva Isabel, no entanto, foi apenas 7% bioacessível. Na forma diglicosídeo, a malvidin-3,5-diglicosídeo, apresentou redução de 90% na transição da fase GPI para IPI. Naturalmente, as antocianinas são altamente reativas e sua estabilidade depende de diferentes fatores, tais como os substituintes do anel, natureza e número de açúcares, temperatura e pH (CLIFFORD, 2000; STRACK; WRAY, 1993).

As antocianinas monoglicosídeos como a malvidina, cianidina e peonidina mostraram-se mais estáveis quanto às alterações de pH e apresentaram menor degradação na transição da fase GPB para a fase IPB, no entanto foram observadas reduções na concentração de antocianinas na fase entérica. A baixa disponibilidade das antocianinas pode ser atribuída à alta instabilidade dessas moléculas na condição alcalina do intestino (PÉREZ-VICENTE; GIL-IZQUIERDO; GARCÍA-VIGUERA, 2002). Estudos demonstram que as antocianinas de uva foram afetadas principalmente por mudanças no pH, com redução de 58% em meio alcalino (TAGLIAZUCCHI et al., 2010). Em estudo de Pineda-Vadillo et al. (2016) as antocianinas foram 30% bioacessíveis após a digestão gastrointestinal simulada.

A maioria dos compostos fenólicos foi significativamente reduzida ($p < 0,05$) na fase intestinal, sugerindo a ocorrência de várias alterações na estrutura química, degradação, aumento ou redução da solubilidade ou interações com outras substâncias que influenciam a

concentração e a bioacessibilidade dos compostos fenólicos. A diversidade dos componentes como polissacarídeos, proteínas, lipídios e elementos inorgânicos podem causar variações na extração e absorção dessas substâncias a partir da matriz. Os compostos bioativos precisam ser extraíveis, portanto bioacessíveis, para se tornarem biodisponíveis para mostrar efeitos benéficos ou atividades biológicas. Os resultados de bioacessibilidade obtidos para os compostos bioativos sugerem que o resíduo de uva (*V. labrusca*) pode ser considerado um material interessante para aplicações alimentares e funcionais.

Figura 2. Cromatogramas do perfil de antocianinas do resíduo de uva (Bordô, *V. labrusca* L.) (A) Fase Oral, (B) Fase Gástrica, (C) Fase Intestinal. Picos: 1: cianidina-3,5-diglicosídeo; 2: delphinidina-3-*O*-glicosídeo; 3: malvidina-3,5-diglicosídeo; 4: cianidina-3-*O*-glicosídeo; 5: peonidina-3-*O*-glicosídeo; 6: malvidina-3-*O*-glicosídeo. TR (A/B/C) = nd/9.3/9.3; TR (A/B/C) = 10.0/10.6/10.6; TR (A/B/C) = 10.8/11.8/11.8; TR (A/B/C) = nd/12.6/12.5; TR (A/B/C) = 14.2/15.5/15.5; TR (A/B/C) = 15.0/16.3/16.3



3.3 Análise de componentes principais

Os compostos fenólicos e a capacidade antioxidante das amostras digeridas foram analisadas utilizando a análise de componentes principais (ACP), onde foi possível confirmar que as três fases de digestão *in vitro* (oral, gástrica e intestinal) foram separadas (Figura 3). Os componentes principais (fator 1 x fator 2) explicaram 100% da variabilidade dos dados após a digestão do resíduo de uva Isabel. O primeiro componente explicou 81% e o segundo componente 19% da dispersão total. Na fase intestinal, a maioria dos compostos, como o ácido gálico, o ácido protocateíco, a epicatequina, o *trans*-caftárico, as antocianinas (malvidina-3-*O*-glicosídeo, peonidina-3-*O*-glicosídeo) e a capacidade antioxidante apresentaram forte associação. Verificou-se que estes compostos eram bioacessíveis na última fase da digestão, sugerindo, portanto, que nesta fase os compostos se tornam disponíveis para serem absorvidos no corpo.

Para a variedade Bordô, os componentes principais (fator 1 x fator 2) explicaram 100% da variabilidade dos dados, com o primeiro componente explicando 79% e o segundo componente 21% da dispersão total. Na fase oral, o ácido cafeico, o ácido siríngico, a peonidina-3-*O*-glicosídeo e a delphinidina-3-*O*-glicosídeo estavam fortemente associadas. A maioria dos compostos estava fortemente associada à fase gástrica, demonstrando o potencial de bioacessibilidade desta fase. O *trans*-resveratrol foi associado com a fase intestinal, confirmando a alta bioacessibilidade deste composto. A análise exploratória confirmou que a variedade de uva e a matriz influenciam o comportamento dos polifenóis durante as fases de digestão. Verificou-se que o resíduo de

uva Isabel apresentou maior associação com compostos fenólicos na última fase de digestão, sugerindo que os polifenóis estão disponíveis para serem absorvidos após digestão simulada.

Figura 3. Análise de componentes principais dos compostos fenólicos individuais e capacidade antioxidante durante a digestão *in vitro* dos resíduos de uva Isabel (A) e Bordô (B). OPI: fase oral Isabel; GPI: fase gástrica Isabel; IPI: fase intestinal Isabel; OPB: fase oral Bordô; GPB: fase gástrica Bordô; IPI: fase intestinal Bordô; GAE, gálico; PROT, protocateíco; VAN, vanílico; SYR, siríngico, CAF, cafeico; CAFT, caftárico; CUM, *para*-cumárico; FER, ferúlico; CAT, catequina; EPI, epicatequina; CYAN-3-*O*, cianidina-3-*O*-glicosídeo; CYAN-3,5, cianidina-3,5-diglicosídeo; MALV-3,5, malvidina-3,5-diglicosídeo; MALV-3-*O*, malvidina-3-*O*-glicosídeo; PEON-3-*O*, peonidina-3-*O*-glicosídeo; DELF-3-*O*, delfinidina-3-*O*-glicosídeo; RESV, *trans*-resveratrol; ABTS e DPPH, capacidade antioxidante utilizando ensaios de sequestro de radicais livres.

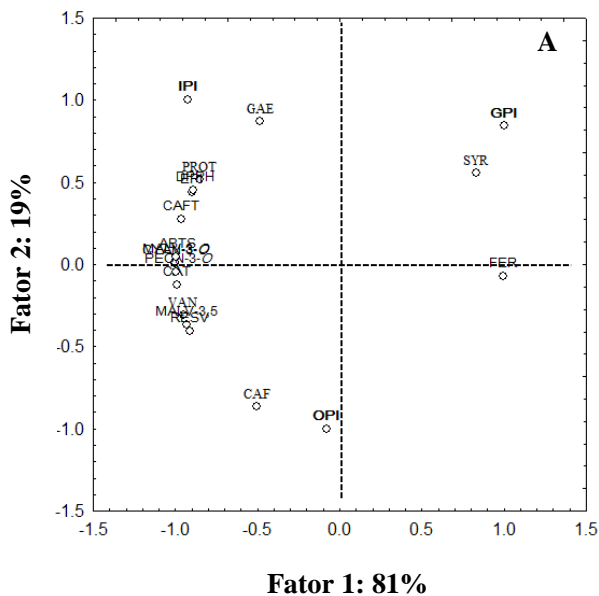
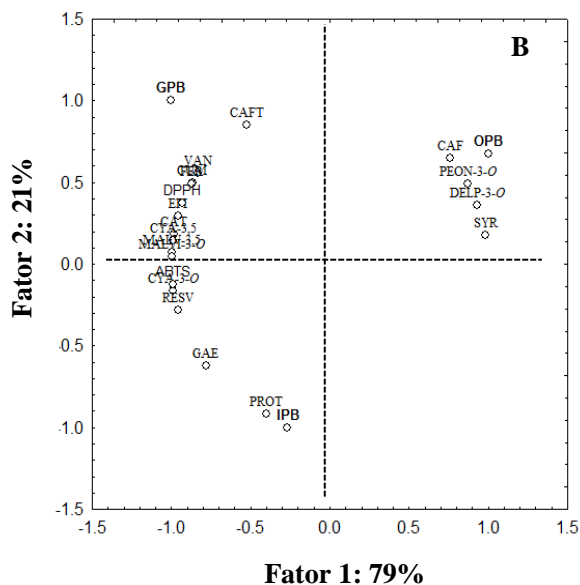


Figura 3. (continuação)

3.4 Efeito da digestão *in vitro* na composição elementar

A composição elementar do resíduo de uva Bordô e Isabel e suas frações digeridas estão apresentadas na Tabela 3. Os minerais essenciais K, Ca e Mg apresentaram altas concentrações nas amostras. Esses minerais são macronutrientes absorvidos do solo pelas plantas e estão presentes em altas concentrações em derivados de uva. A concentração de K foi a maior entre os macronutrientes estudados e, durante a digestão *in vitro*, houve uma redução significativa em sua concentração. Nas plantas, o K é um dos elementos mais abundantes, seguido pelo Ca e Mg, e após a digestão, suas concentrações reduzem (DIAS et al., 2016). O potássio é um elemento essencial para o organismo, contribuindo para a regulação da homeostase, atividade

neuromuscular e promovendo o crescimento muscular (MORENO-ROJAS; CÁMARA-MARTOS; AMARO LÓPEZ, 2016). As concentrações de Ca nas amostras não digeridas de resíduo de uva Bordô e Isabel foram 1,4 e 0,98 mg/g, respectivamente, sendo significativamente reduzidas durante a digestão *in vitro*. A deficiência de cálcio na dieta pode levar a vários distúrbios, como osteoporose e doenças crônicas, como câncer de cólon e hipertensão, enquanto a ingestão elevada pode causar hipercalcemia, levando à calcificação excessiva dos rins (WOOD; ZHENG, 1997). Os macroelementos Ca e K são importantes para o controle da pressão arterial (GHARIBZAHEDI; JAFARI, 2017).

A composição de oligoelementos também foi determinada no resíduo de uva e suas frações bioacessíveis, a fim de avaliar a presença e bioacessibilidade de elementos potencialmente tóxicos. Níquel e Pb não foram detectados nas amostras e as concentrações de Al, Sr e Cu ficaram abaixo do limite de detecção do método após a digestão simulada. Os metais e semi-metais são potencialmente tóxicos, levando a sintomas agudos nos rins, fígado, coração, sistema vascular e sistema imunológico (JAISHANKAR et al., 2014). Apesar da baixa bioacessibilidade encontrada neste estudo, as amostras apresentaram uma ampla composição mineral. As baixas concentrações de minerais podem estar relacionadas ao maior volume de fluido intestinal ao final da digestão, conseqüentemente, menores concentrações de minerais foram observadas nas frações bioacessíveis quando comparadas à amostra não digerida. Além disso, alguns minerais podem ter sido perdidos nas amostras residuais (fração não digerida) ou precipitado durante a passagem gastrointestinal simulada.

Tabela 3. Composição elementar de resíduos de uva após simulação gastrointestinal.

<i>Amostras</i>	<i>Elementos</i>										
	K (mg/g)	Ca (mg/g)	Mg (mg/g)	Cu (µg/g)	Fe (µg/g)	Mn (µg/g)	Zn (µg/g)	Al (µg/g)	Sr (µg/g)	Ni (µg/g)	Pb (µg/g)
GJSB	6,8 ^a ±0,5	1,4 ^a ±0,1	0,35 ^a ±0,01	110 ^a ±10	630 ^a ±60	13,0 ^a ±0,1	18 ^a ±8	1,2 ^a ±0,1	0,9 ^a ±0,1	<LD	<LD
CSB	0,21 ^b ±0,01	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
OPB	0,15 ^b ±0,01	0,2 ^b ±0,1	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
GPB	0,20 ^b ±0,02	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
IPB	0,08 ^b ±0,01	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
GJSI	8,7 ^a ±0,2	0,98 ^a ±0,02	0,40 ^a ±0,01	123 ^a ±3	244 ^a ±4	11,0 ^a ±0,3	8 ^a ±1	1,9 ^a ±0,1	1,18 ^a ±0,04	<LD	<LD
CSI	0,20 ^b ±0,01	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
OPI	0,15 ^b ±0,01	0,31 ^b ±0,05	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
GPI	0,23 ^b ±0,03	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
IPI	0,07 ^b ±0,01	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD

Os resultados são expressos como média ± desvio padrão. Letras diferentes entre linhas indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras digeridas da mesma variedade. GJSB: Resíduo de uva Bordô, CSB: Controle do resíduo de uva Bordô, OPB: Fase oral Bordô, GPB: Fase gástrica Bordô, IPB: Fase intestinal Bordô, NDFB: Fração não digerível Bordô, GJSI: Resíduo de uva Isabel, CSI: Controle do resíduo de uva Isabel, OPI: fase oral Isabel, GPI: fase gástrica Isabel, IPI: fase intestinal Isabel, NDFI: fração não digerível Isabel, nd = não detectado, LD = limite de detecção. $LD_K = 0.01 \mu\text{g/g}$, $LD_{Sr} = 0.2 \mu\text{g/g}$, $LD_{Ca} = 0.03 \text{mg/g}$, $LD_{Mg} = 0.01 \text{mg/g}$, $LD_{Cu} = 1 \mu\text{g/g}$; $LD_{Fe} = 6 \mu\text{g/g}$, $LD_{Mn} = 0.4 \mu\text{g/g}$, $LD_{Zn} = 1 \mu\text{g/g}$, $LD_{Al} = 0.4 \text{mg/g}$; $LD_{Ni} = 2 \mu\text{g/g}$, $LD_{Pb} = 2 \mu\text{g/g}$.

4. CONCLUSÃO

A identificação de novas fontes de bioativos disponíveis no meio ambiente tornou-se importante para os segmentos alimentício e nutracêutico. Um modelo de digestão padronizado foi utilizado para caracterizar o potencial nutricional e bioativo dos resíduos de uva em termos de bioacessibilidade de minerais e compostos fenólicos. Altos níveis de polifenóis bioacessíveis foram encontrados nas frações digeridas, particularmente na fase gástrica. Os resíduos de uva Isabel e Bordô, bem como suas frações bioacessíveis, apresentaram alta capacidade antioxidante e alta concentração de compostos fenólicos que foram afetadas pelo meio gástrico e intestinal. A maioria dos minerais e oligoelementos essenciais não foram detectados ao final da digestão, o que pode estar relacionado a perdas na fração não digerida ou diluição na última fase da digestão. A variedade da uva teve grande influência na composição fenólica durante a passagem gastrointestinal. O resíduo de uva pode ser útil para produzir alimentos com propriedades funcionais e nutracêuticas

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Vinícola Poggere por fornecer a matéria-prima. Este estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil.

REFERÊNCIAS

- ATTRI, S.; SINGH, N.; SINGH, T.R.; GOEL, G. Effect of *in vitro* gastric and pancreatic digestion on antioxidant potential of fruit juices. **Food Bioscience**, v. 17, p. 1–6, 2017.
- BAKER, I.; CHOCHAN, M.; OPARA, E.I. Impact of cooking and digestion, *in vitro*, on the antioxidant capacity and anti-inflammatory activity of cinnamon, clove, and nutmeg. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 68, p. 364–369, 2013.
- BERMÚDEZ-SOTO, M.J.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; GARCÍA-CONESA, M.T. Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to *in vitro* gastric and pancreatic digestion. **Food Chemistry**, v. 102, p. 865–874, 2007.
- BROWN, L.; CALIGIURI, S.P.B.; BROWN, D.; PIERCE, G.N. Clinical trials using functional foods provide unique challenges. **Journal of Functional Foods**, v. 45, p. 233–238, 2018.
- BURIN, V.M.; FERREIRA-LIMA, N.E.; PANCERI, C.P.; BORDIGNON-LUIZ, M.T. Bioactive compounds and antioxidant activity of *Vitis vinifera* and *Vitis labrusca* grapes: Evaluation of different extraction methods. **Microchemical Journal**, v. 114, p. 155–163, 2014.
- CARDOSO, C.; AFONSO, C.; LOURENÇO, H.; COSTA, S.; NUNES, M.L. Bioaccessibility assessment methodologies and their consequences for the risk-benefit evaluation of food. **Trends in Food Science Technology**, v. 41, p. 5–23, 2015.
- CILLA, A.; GONZÁLEZ-SARRÍAS, A.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; ESPÍN J.C.; BARBERÁ, R. Availability of polyphenols in fruit beverages subjected to *in vitro* gastrointestinal digestion and their effects on proliferation, cell-cycle and apoptosis in human colon cancer Caco-2 cells. **Food Chemistry**, v. 114, p. 813–820, 2009.
- CLIFFORD, M.N. Anthocyanins-nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 1063–1072, 2000.

DIAS, M.I.; MORALES, P.; BARREIRA, J.C.M.; OLIVEIRA, M.B.P.P.; SÁNCHEZ-MATA, M.C.; FERREIRA, I.C.F.R. Minerals and vitamin B9 in dried plants vs. infusions: Assessing absorption dynamics of minerals by membrane dialysis tandem *in vitro* digestion. **Food Bioscience**, v. 13, p. 9–14, 2016.

DIPLOCK, A.T.; AGGETT, P.J.; ASHWELL, M.; BORNET, F.; FERN, E.B.; ROBERFROID, M. Scientific concepts of functional foods in Europe: Consensus document. **British Journal of Nutrition**, v. 81(4), S1eS27, 1999.

FERNÁNDEZ-GARCÍA, E.; CARVAJAL-LÉRIDA, I.; PÉREZ-GÁLVEZ, A. *In vitro* bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. **Nutrition Research**, v. 29, p. 751–760, 2009.

GAYOSO, L.; CLAERBOUT, A.S.; CALVO, M.I.; CAVERO, R.Y.; ASTIASARÁN, I.; ANSORENA, D. Bioaccessibility of rutin, caffeic acid and rosmarinic acid: Influence of the *in vitro* gastrointestinal digestion models. **Journal of Functional Foods**, v. 26, p. 428–438, 2016.

GHARIBZAHEDI, S.M.T.; JAFARI, S.M. The importance of minerals in human nutrition: Bioavailability, food fortification, processing effects and nanoencapsulation. **Trends in Food Science Technology**, v. 62, p. 119-132, 2017.

GIOVINAZZO, G.; GRIECO, F. Functional properties of grape and wine polyphenols. **Plant Foods for Human Nutrition**, v.70, p. 454-62, 2015.

GRANADO-LORENCIO, F.; OLMEDILLA-ALONSO, B.; HERRERO-BARBUDO, C.; BLANCO-NAVARRO, I.; PÉREZ-SACRISTÁN, B.; BLÁZQUEZ-GARCÍA, S. Comparative *in vitro* bioaccessibility of carotenoids from relevant contributors to carotenoid intake. **Food Chemistry**, v. 102, p. 641–648, 2008.

GROSSO, G.; STEPANIAK, U.; TOPOR-MADRY, R.; SZAFRANIEC, K.; PAJAK, A. Estimated dietary intake and major food sources of polyphenols in the Polish arm of the HAPIEE study. **Nutrition**, v. 30, p. 1398–1403, 2014.

GULLON, B.; PINTADO, M.E.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J.A.; VIUDA-MARTOS, M. *In vitro* gastrointestinal digestion of pomegranate peel (*Punica granatum*) flour obtained from co-products: Changes in the antioxidant potential and bioactive compounds stability. *Journal Functional Foods*, v. 19, p. 617-628, 2015.

GUPTA, R.; MUSALLAM, K.M.; TAHER, A.T.; RIVELLA, S. Ineffective erythropoiesis: Anemia and iron overload. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, v. 32, p. 213-221, 2017.

HAAS, I.C.S.; TOALDO, I.M.; DE GOIS, J.S.; BORGES, D.L.G.; PETKOWICZ, C.L.O.; BORDIGNON-LUIZ, M.T. Phytochemicals, monosaccharides and elemental composition of the non-pomace constituent of organic and conventional grape juices (*Vitis labrusca* L.): Effect of drying on the bioactive content. **Plant Foods Human Nutrition**, v. 71, p. 422-428, 2016.

HAAS, I.C.S.; TOALDO, I.M.; BURIN, V.M.; BORDIGNON-LUIZ, M.T. Extraction optimization for polyphenolic profiling and bioactive enrichment of extractives of non-pomace residue from grape processing. **Industrial Crops and Products**, v. 112, p. 593-601, 2018.

JAISHANKAR, M.; TSETEN, T.; ANBALAGAN, N.; MATHEW, B.B.; BEEREGOWDA, K.N. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. **Interdisciplinary Toxicology**, v.7, p. 60–72, 2014.

KAMILOGLU, S.; CAPANOGLU, E.; BILEN, F.D.; GONZALES, G.B.; GROOTAERT, C.; VAN DE WIELE, T.; VAN CAMP, J. Bioaccessibility of polyphenols from plant-processing byproducts of black carrot (*Daucus carota* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, p. 2450–2458, 2016.

KIM, Y.K.; GUO, Q.; PACKER, L. Free radical scavenging activity of red ginseng aqueous extracts. **Toxicology**, v. 172, p. 149-156, 2002.

MANACH, C.; WILLIAMSON, G.; MORAND, C.; SCALBERT, A. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, 230S-242S, 2005.

MINEKUS et al. A standardized static *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus. **Food & Function**, v.5, p. 1113–1124, 2014.

MORENO-ROJAS, R.; CÁMARA-MARTOS, F.; AMARO LÓPEZ, M.Á. Potassium: Properties and determination. **Encyclopedia of Food and Health**, p.329-445, 2016.

ORTEGA, N.; MACIÀ, A.; ROMERO, M.P.; REGUANT, J.; MOTILVA, M.J. Matrix composition effect on the digestibility of carob flour phenols by an *in-vitro* digestion model. **Food Chemistry**, v. 124, p. 65–71, 2011.

PANDEY, K.B.; RIZVI, S.I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2:5, p. 270-278, 2009.

PÉREZ-VICENTE, A.; GIL-IZQUIERDO, A.; GARCÍA-VIGUERA, C. *In vitro* gastrointestinal digestion study of pomegranate juice phenolic compounds, anthocyanins, and vitamin C. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50(8), p. 2308-12, 2002.

PINEDA-VADILLO, C.; NAU, F.; DUBIARD, C.G.; CHEYNIER, V.; MEUDEEC, E.; SANZ-BUENHOMBRE, M.; GUADARRAMA, A.; TÓTH, T.; CSAVAJDA, É.; HINGYI, H.; KARAKAYA, S.; SIBAKOV, J.; CAPOZZI, F.; BORDONI, A.; DUPONT, D. *In vitro* digestion of dairy and egg products enriched with grape extracts: Effect of the food matrix on polyphenol bioaccessibility and antioxidant activity. **Food Research International**, v. 88, p. 284-292, 2016.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGEMNTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, p 1231–1237, 1999.

REVILLA, I.; PÉREZ-MAGARIÑO, S.; GONZÁLEZ-SANJOSÉ, M.L.; BELTRÁN, S. Identification of anthocyanin derivatives in grape skin extracts and red wines by liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 847, p. 83-90, 1999.

STRACK, D.; WRAY, V. The anthocyanins. In J.B. Harborne (Ed.), **The Flavonoids – Advances in Research Since 1986**. Boca Raton, FL, CRC Press. p. 1–19, 1993.

TAGLIAZUCCHI, D.; VERZELLONI, E.; BERTOLINI, D.; CONTE, A. *In vitro* bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. **Food Chemistry**, v. 120, p. 599–606, 2010.

TOALDO, I.M.; VAN CAMP, J.; GONZALES, G.B.; KAMILOGLU, S.; BORDIGNON-LUIZ, M.T.; SMAGGHE, G.; RAES, K.; CAPANOGLU, E.; GROOTAERT, C. Resveratrol improves TNF- α -induced endothelial dysfunction in a coculture model of a Caco-2 with an endothelial cell line. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 36, p. 21–30, 2016.

WOOD, R.J.; ZHENG, J.J. High dietary calcium intakes reduce zinc absorption and balance in humans. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 65, p. 1803-1809, 1997.

CAPITULO 4

ATIVIDADE CITOTÓXICA DO RESÍDUO DE UVA (*VITIS LABRUSCA* L.) OBTIDO DO PROCESSAMENTO DO SUCO E DE SUAS FRAÇÕES BIOACESSÍVEIS APÓS SIMULAÇÃO GASTROINTESTINAL *IN VITRO*

Isabel Cristina da Silva Haas¹, Isabela Maia Toaldo¹, Diorge Jônatas Marmitt², Márcia Inês Goettert² e Marilde T. Bordignon-Luiz^{1*}.

¹Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Admar Gonzaga Rd. 1346, Itacorubi, 88034-001, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.

²Laboratório de cultura de célula, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Centro Universitário UNIVATES, Av. Avelino Tallini, 171, CEP: 959000-000 Lajeado, Rio Grande do Sul, Brazil.

RESUMO

Os resíduos das indústrias vitivinícolas são excelentes fontes de compostos fenólicos com propriedades bioativas, e o consumo de polifenóis está associado à redução do risco de doenças crônicas. Avaliar a ação antiproliferativa do resíduo do processamento do suco de uva é importante para sua valorização e utilização tecnológica. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito antiproliferativo *in vitro* do resíduo de uva, das frações bioacessíveis e dos fenólicos individuais em células saudáveis e carcinogênicas. As linhagens celulares utilizadas para os ensaios citotóxicos foram as células de macrófagos (Raw 264.7), gástricas (ACP02, ACP03 e MN01), hepática (HepG2) e do cólon (Caco-2). O efeito antiproliferativo do resíduo de uva e das frações bioacessíveis foram avaliadas utilizando o ensaio de MTT (brometo de 3- [4, 5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio). Os resíduos de uvas da variedade Bordô e Isabel inibiram significativamente ($p < 0,05$) a proliferação celular do câncer de cólon (Caco-2). A viabilidade celular do câncer de cólon (Caco-2) após o tratamento com os polifenóis catequina, quercetina e miricitina foi de 72,00; 56,47 e 51,07% respectivamente. A viabilidade do adenocarcinoma gástrico (ACP02) aumentou significativamente ($p < 0,05$) após o tratamento com as frações bioacessíveis (FIB e FGI), no entanto, não houve efeito significativo na proliferação celular da linhagem Mn01 e ACP03 após o tratamento com o resíduo de uva e as frações bioacessíveis. A fração bioacessível (FGI) reduziu a proliferação do carcinoma hepático (HepG2). As frações bioacessíveis do resíduo de uva Isabel e Bordô (500 $\mu\text{g/ml}$) induziram a proliferação celular da linhagem Raw 264.7. Em relação à atividade antiproliferativa dos compostos fenólicos individuais, a quercetina e miricitina (200 mM) demonstraram alta atividade no tratamento da linhagem Caco-2 e HepG2, sendo que a viabilidade celular foi de 56,47 e 51,07% e 33,96 e 27,03% respectivamente. Os fenólicos individuais apresentaram maior efeito antiproliferativo que os resíduos de uvas e as frações bioacessíveis, sendo que a miricitina apresentou os maiores efeitos citotóxicos. Os resultados indicam atividade citotóxica moderada do resíduo de uva, mais pesquisas são necessárias para avaliar seu potencial bioativo, visando futuras aplicações na indústria alimentícia.

Palavras-chave: Resíduo de uva. Polifenóis. Potencial Bioativo. Digestão *in vitro*. Atividade antiproliferativa.

1.INTRODUÇÃO

A uva e seus derivados são ricos em compostos fenólicos com propriedades bioativas (TOALDO et al., 2015, HAAS et al., 2018). Durante a produção do suco de uva, os polifenóis da uva são transferidos para o suco, mas uma proporção elevada destes compostos ainda permanece nos resíduos sólidos provenientes deste processamento. Os resíduos deste estudo foram obtidos da etapa de centrifugação do suco de uva, onde foram retirados os sólidos que estavam em suspensão, o que corresponde a 4-8% do volume total de suco processado. A extração de polifenóis a partir de resíduos provenientes das práticas industriais representa uma fonte sustentável e econômica de compostos bioativos de alto valor biológico (HAAS et al., 2018). O consumo de polifenóis é associado com a redução de doenças crônicas, como doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e câncer (VAUZOUR et al., 2010). Estudos epidemiológicos relatam a relação entre a ingestão de alimentos ricos em polifenóis e a redução de doenças crônico-degenerativas (RIMM, 2002; CHIRA et al., 2008). As propriedades anticancerígenas dos polifenóis são atribuídas à sua capacidade de iniciar mudanças na expressão gênica, resultando em apoptose ou necrose de células cancerígenas, diminuindo a iniciação, promoção e progressão do tumor (LEE, 2014; RAMOS, 2011).

O câncer está entre os principais problemas de saúde pública no mundo, com milhões de novos pacientes diagnosticados a cada ano e muitas mortes resultantes desta doença (BOCKERSTETT, DIPAOLO, 2017). O câncer gástrico é a terceira causa de morte por câncer no mundo e o quinto tipo mais incidente. A incidência do câncer gástrico

tem relação com a presença da bactéria *Helicobacter pylori*, a gastrite inflamatória crônica associada com a infecção por *H. pylori* proporciona mudanças histopatológicas na mucosa gástrica, o que progride de gastrite crônica à atrofia, metaplasia, displasia e carcinoma (BORNSCHEIN et al. 2010; LEE et al., 2012). Em relação ao carcinoma hepatocelular, este é o quinto câncer mais frequentemente diagnosticado em homens em todo o mundo e a segunda causa mais frequente de morte por câncer. Já o câncer de cólon é o terceiro câncer mais comum e a segunda principal causa de morte relacionada ao câncer em todo o mundo, é uma neoplasia maligna comum no sistema digestivo (JERNAL et al., 2011; TORRE et al., 2015; HEMERYCK et al., 2016).

O consumo de vegetais pode auxiliar na prevenção de vários tipos de câncer, pois são fonte de compostos fenólicos com alto potencial bioativo. Frutas e vegetais são amplamente investigados para a prevenção e controle do câncer, pois contêm fitoquímicos que podem restringir o desenvolvimento e a progressão do câncer pela inibição do crescimento de tumores e metástases e induzir a apoptose e interrupção do ciclo celular (TAO et al., 2018). A busca de alimentos que possam prevenir de forma segura e efetiva o desenvolvimento do câncer continua a ser uma prioridade. Estudos sugerem que o consumo de alimentos ricos em polifenóis está associado a uma menor incidência de câncer. A utilização de extratos vegetais e fitoquímicos são interessantes para o desenvolvimento de produtos com propriedades anti-inflamatórias e anticarcinogênicas.

Até o presente momento não foram relatados estudos biológicos com o resíduo de uva obtido da centrifugação do suco e com as frações bioacessíveis obtidas após a simulação gastrointestinal *in vitro*. No

entanto, é observado em alguns estudos que o bagaço de uva apresenta elevada atividade antiproliferativa, tornando-se importante avaliar a atividade antiproliferativa do resíduo de uva que foi obtido da centrifugação do suco. Avaliar o efeito antiproliferativo das frações bioacessíveis é importante para compreender o efeito da digestão simulada sobre o potencial bioativo deste material, visando a aplicação deste resíduo em alimentos funcionais e nutracêuticos. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito antiproliferativo do resíduo do processamento do suco de uva Bordô e Isabel, frações bioacessíveis e fenólicos individuais em células saudáveis e carcinogênicas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Reagentes químicos

As enzimas pepsina da mucosa gástrica suína e pancreatina do pâncreas suíno, sais biliares hidrato de taurocolato de sódio, glicooxicolato de sódio, hidrato de taurodesoxicolato de sódio, antibiótico estreptomicina e penicilina, aminoácidos, meio de cultura DMEN (meio de Eagle modificado por Dulbecco), MTT (brometo de [3- (4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]) e azul de tripano foram adquiridos a Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). O dimetilsulfóxido (DMSO) foi adquirido em Synth (São Paulo, Brasil). A enzima tripsina, soro bovino fetal (SFB) e meio de cultura RPMI (Roswell Park Memorial Institute) foram adquiridos da Cultilab (Campinas, Brasil). Os fenólicos, catequina, quercetina e miricetina foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA).

2.2 Elaboração do suco de uva e obtenção do resíduo de uva

Os sucos das uvas Bordô e Isabel (*V. labrusca* L.) foram processados separadamente em processo de escala industrial. As extrações dos sucos foram realizadas em tanque de aço inox com temperatura controlada (85 ± 1 °C, 10s). Após duas horas de extração, o bagaço de uva foi removido por prensagem mecânica (EDA, São Paulo, Brasil) e o suco de uva foi bombeado para uma centrífuga decantadora 600 Peralisi (Jesi, Itália) para clarificação (5000 rpm, 10 min), na etapa de centrifugação o resíduo foi coletado e armazenado a -18 °C. As amostras foram liofilizadas em liofilizador (Modelo Favvel-LT, Terroni) por 24 horas, trituradas, tamisadas (20 mesh) e armazenadas a -20 °C. A composição bioativa e capacidade antioxidante *in vitro* do resíduo de uva foi previamente relatada por Haas et al. (2018).

2.3 Digestão *in vitro*

O resíduo de uva Bordô e Isabel (*Vitis labrusca* L.) (Item 2.2) foram submetidos a digestão *in vitro* conforme descrito por Minekus et al. (2014). Este método de digestão consiste de três fases principais, a fase oral, gástrica e intestinal. Na fase gástrica, o líquido gástrico (pH 3,0), pepsina (2000 U/ml) e CaCl_2 ($0,075 \text{ mol L}^{-1}$) foram adicionados à mistura oral e mantidos em banho termostático por 2 horas a 37 °C. Após a digestão gástrica, a mistura foi submetida à fase intestinal pela adição do fluido intestinal, pancreatina (800 U/ml), sais biliares (10 mol L^{-1}) e CaCl_2 ($0,3 \text{ mol L}^{-1}$), com o pH ajustado para 7,0 com NaOH 1M. A mistura intestinal foi incubada por mais 2 horas em banho

termostático a 37 °C. As fases gástrica e intestinal foram centrifugadas a 4000 rpm durante 10 min e o sobrenadante foi utilizado como amostra bioacessível. A composição fenólica individual e capacidade antioxidante *in vitro* do resíduo de uva após a digestão *in vitro* foi previamente relatada por Haas et al., 2019.

2.4 Linhagem celular

Os macrófagos murinos (Raw 264.7), o adenocarcinoma colorretal (Caco-2) e o carcinoma hepatocelular humano (HepG2) foram adquiridos no Rio de Janeiro - Cell Bank. As células de epitélio gástrico (MN01) e células de adenocarcinomagástrico humano (ACP02 – região da cárdia e ACP03 – região do antro pilórico) foram doadas pelo professor Dr. Diego Bonatto do Laboratório de Biologia Computacional e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

A linhagem celular Caco-2 foi cultivada em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium)-Low Glucose. A linhagem celular HepG2 foi cultivada em meio DMEM com 1% de aminoácido e a linhagem celular Raw 264.7 foi cultivada em meio DMEM com profilático, ambos suplementado com soro fetal bovino a 10% (Cultilab). As células foram incubadas a 37°C em estufa com atmosfera umidificada, contendo 5% de CO₂. As células Caco-2 (20-25^o passagem) e HepG2 (30-35^o passagem) foram plaqueadas em placas de 96 poços com densidade de 3,0x10³ e 3,5x10³ respectivamente, os tratamentos foram iniciados 24 horas após o plaqueamento e após 48 horas foi quantificada as células viáveis. A célula Raw 264.7 (5-10^o

passagem) foi plaqueada a uma densidade de $3,0 \times 10^3$ e o tratamento foi realizado após 3 horas e a viabilidade celular foi quantificada após 24 horas de tratamento.

As células de epitélio gástrico (MN01) e células de adenocarcinomagástrico humano foram cultivadas em meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) suplementado com 10% de FBS. As células gástricas foram plaqueadas na densidade de 2×10^3 , o tratamento foi realizado após 24 horas e a viabilidade celular avaliada após 24 horas de tratamento. Além dos tratamentos com as amostras, em cada experimento foi realizado um controle positivo, no qual as células foram estimuladas com DMSO e um controle negativo que consistiu em meio de cultura.

2.5 Atividade citotóxica

A atividade citotóxica do resíduo de uva Bordô e Isabel e suas frações bioacessíveis (fase gástrica e intestinal) foram avaliadas pelo ensaio de MTT (brometo de 3-[4, 5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) que mede a taxa de proliferação celular. Os resíduos de uva Bordô e Isabel (EB e EI) foram diluídos com DMSO. Os tratamentos com as amostras foi realizado na concentração de 200 e 500 $\mu\text{g/ml}$. Após o plaqueamento da linhagem celular o tratamento com as amostras foi realizado descartando o sobrenadante e adicionando 200 μL do corante MTT (5 mg/mL , Sigma) dissolvido em meio, após 3 horas, o meio foi retirado e 200 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados para a solubilização dos cristais de formazan. A absorbância das amostras foi medida pelo leitor ELISA "Enzyme Linked Immuno

Sorbent Assay" (SpectraMax i3®) a 570 nm. A viabilidade celular foi calculada usando a equação 1:

$$(1) \text{ Viabilidade celular} = (A_a/A_c) \times 100\%$$

A_a é a absorbância das células após tratamento com a amostra e A_c é a absorbância do controle.

2.6 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas usando GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc). A significância estatística foi avaliada usando análise de variância ANOVA seguida pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Todas as análises foram realizadas em triplicatas e os resultados expressos como média \pm desvio padrão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

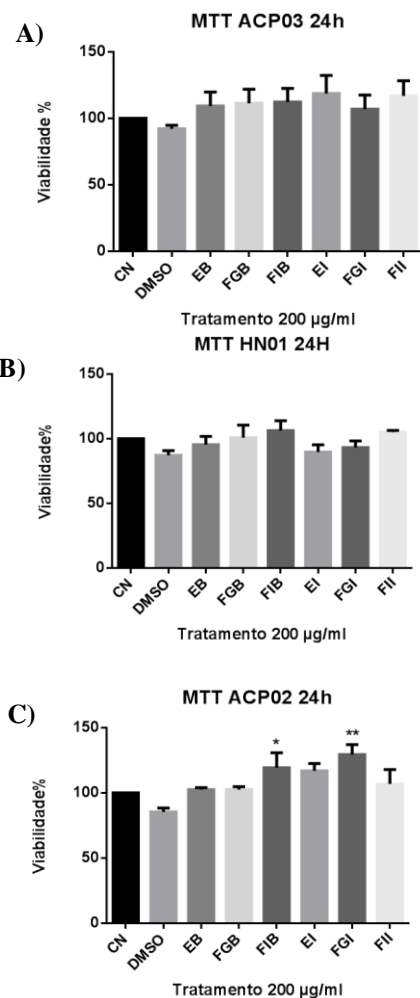
3.1 Atividade antiproliferativa *in vitro*

As amostras de resíduo de uva Bordô e Isabel e suas frações bioacessíveis foram avaliadas quanto ao seu efeito antiproliferativo utilizando diferentes linhagens celulares. Na Figura 1 está apresentado o efeito antiproliferativo do resíduo de uva em linhagem de câncer gástrico (ACP02 e ACP03) e mucosa normal do estômago (Mn01). O resíduo de uva Bordô e Isabel e suas frações bioacessíveis não foram tóxicas às células, não reduzindo a viabilidade celular da linhagem

gástrica saudável (Mn01) após 24 horas de tratamento. O tratamento da linhagem carcinogênica da região cárdia (ACP02) com as frações bioacessíveis (FIB e FGI) não diminui a viabilidade celular quando comparado ao controle (CN). Os resíduos de uvas e suas frações bioacessíveis também não reduziram a viabilidade celular da linhagem cancerígena da região do antro pilórico (ACP03) quando comparado ao controle (CN).

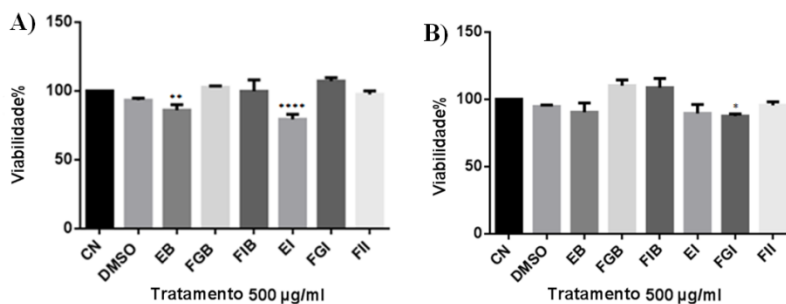
Estudos relatam a relação entre a ingestão de alimentos ricos em polifenóis e a redução de doenças crônico-degenerativas (CHIRA et al., 2008; RIMM, 2002). Geralmente os polifenóis estão presentes em alimentos nas formas polimérica, glicosídica ou ésteres, o que afeta sua biodisponibilidade e bioeficácia final nos tecidos-alvo (MANACH et al., 2004). O efeito dos compostos fenólicos sobre a saúde humana depende da sua bioacessibilidade e conseqüente biodisponibilidade. Estes dados demonstram a importância do resíduo de uva e da fração bioacessível, com o propósito de utilizar este material na quimioproteção do câncer.

Figura 1. Viabilidade celular de linhagens gástricas tratadas com os resíduos de uvas e as frações bioacessíveis. (A) ACP03, (B) ACP02, (C) Mn01. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão. Para o controle (CN) foi atribuído um valor de 100%. *Representa diferença significativa ($p < 0,05$) no tratamento com as amostras em relação ao controle. CN, controle negativo; DMSO, dimetilsulfóxido; EB, resíduo de uva bordô; FGB, fase gástrica Bordô; FIB, fase intestinal Bordô; EI, resíduo de uva Isabel; FGI, fase gástrica Isabel; FII, fase intestinal Isabel.



Os resultados referentes a viabilidade celular das linhagens Caco-2 e HepG2 após o tratamento com o resíduo de uva e as frações bioacessíveis estão apresentados na Figura 2. O tratamento da linhagem Caco-2 (Figura 2-A) com o resíduo de uva Bordô e Isabel (EB e EI) apreentou viabilidade celular de 86,04 e 79,38% respectivamente. As frações bioacessíveis não apresentaram ação antiproliferativa sobre o adenocarcinoma do cólon (Caco-2). Em estudo de Jara-Palacios et al., 2015, o tratamento da linhagem Caco-2 com o bagaço de uva (100 µg/ml) inibiu a proliferação celular em 52,1%. Estudos farmacocinéticos mostraram que *in vivo*, asementes de uva dificilmente podem ser absorvidas ou metabolizadas durante o trânsito do trato gastrointestinal, permitindo que os compostos fenólicos atinjam o cólon em altas concentrações, o que pode justificar o efeito antiproliferativo do bagaço de uva em células de andencarcinoma de cólon (Caco-2) (FRAGA; OTEIZA et al., 2011).

Figura 2. Viabilidade celular de linhagens de carcinoma do cólon humano (Caco-2) (A) e carcinoma hepatocelular (HepG2) (B) tratados com os resíduos de uvas e as frações bioacessíveis. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão. Para o controle (CN) foi atribuído um valor de 100%. *Representa diferença significativa ($p < 0,05$) no tratamento com as amostras em relação ao controle. CN, controle negativo; DMSO, dimetilsulfóxido; EB, resíduo de uva bordô; FGB, fase gástrica Bordô; FIB, fase intestinal Bordô; EI, resíduo de uva Isabel; FGI, fase gástrica Isabel; FII, fase intestinal Isabel.

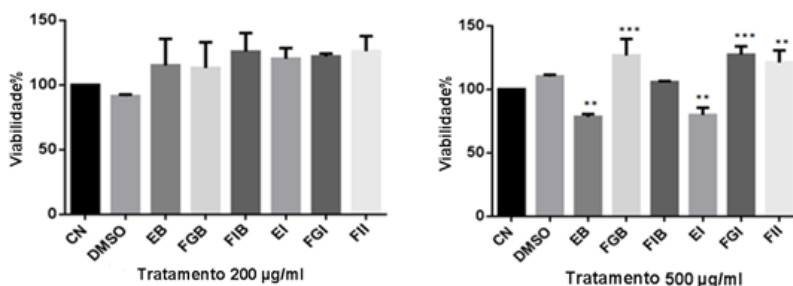


O tratamento da linhagem HepG2 realizado com os resíduos de uvas e com suas frações bioacessíveis (Figura 2-B) demonstrou que os tratamentos não apresentaram ação antiproliferativa sobre o adenocarcinoma hepático, com exceção da amostra FGI que reduziu significativamente ($p < 0,05$) a proliferação celular, onde a viabilidade celular foi de 87,59%. De acordo com Haas et al. (2019) a fração bioacessível da amostra de resíduo da uva Isabel (FGI) apresenta alta concentração de *trans*-resveratrol, o que pode justificar os resultados apresentados. O *trans*-resveratrol é postulado como um possível agente quimiopreventivo, pois suprime a proliferação celular pela estimulação de caspase 3 e citocromo oxidases, quebra de proteínas nucleares e também a perda de viabilidade celular e aumento da senescência celular (ZULUETA et al., 2015). Os polifenóis da uva demonstram atividade

antineoplásica, inibindo o crescimento de diferentes linhagens celulares de câncer (VERGARA-SALINAS et al., 2015).

A viabilidade celular da linhagem de macrófagos (Raw 264.7) foi avaliada após o tratamento com os resíduos de uvas e suas frações bioacessíveis (Figura 3). Os macrófagos são importantes para o sistema natural de defesa imunológica dos hospedeiros e possuem importantes funções de regulação imunológica. O tratamento utilizando amostras na concentração de 200 $\mu\text{g/ml}$ não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) na viabilidade celular, assim foi realizado outro tratamento avaliando o efeito utilizando amostras nas concentrações de 500 $\mu\text{g/ml}$.

Figura 3. Viabilidade da célula Raw 264.7 após o tratamento com o resíduo de uva e a fração bioacessível na concentração de 200 e 500 $\mu\text{g/ml}$. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão. Para o controle (CN) foi atribuído um valor de 100%. *Representa diferença significativa ($p < 0,05$) no tratamento com as amostras em relação ao controle. CN, controle negativo; DMSO, dimetilsulfóxido; EB, resíduo de uva Bordô; FGB, fase gástrica Bordô; FIB, fase intestinal Bordô; EI, resíduo de uva Isabel; FGI, fase gástrica Isabel; FII, fase intestinal Isabel.



No tratamento da linhagem Raw 264.7 com as amostras em concentração de 500 $\mu\text{g/ml}$ foi observada diferença significativa ($p < 0,05$), com exceção da amostra FIB. A viabilidade celular da linhagem Raw 264.7 após tratamento com as amostras EB e EI foram

semelhantes, 78,35 e 79,83% respectivamente. Após o tratamento com as frações bioacessíveis da fase gástrica (FGB e FGI) a viabilidade celular foi de 126,67 e 127,26% respectivamente. Os resultados demonstram que o tratamento com as frações bioacessíveis promoveu o aumento da viabilidade celular. Avaliar o efeito do tratamento das linhagens celulares saudáveis e carcinogênicas é importante, pois a maioria das drogas contra o câncer induz a efeitos colaterais sérios ao paciente, como efeitos adversos nas células saudáveis.

3.2 Efeito dos compostos fenólicos na viabilidade celular

O efeito antiproliferativo dos compostos fenólicos individuais: catequina, quercetina e miricetina foi avaliado em ensaios com as linhagens celulares Raw 264.7, HepG2 e Caco-2 (Tabela 1). Estudos comprovam que estes fenólicos apresentam atividade antiproliferativa *in vitro* (JARA-PALACIOS et al., 2015; SÁEZ et al., 2018). Para ser considerado antiproliferativo o composto fenólico deve inibir a viabilidade celular em 50%. Os fenólicos têm uma ampla função biológica, como propriedades anti-inflamatórias, vasodilatadoras, anticoagulantes e pró-apoptóticas. Avaliar individualmente a funcionalidade de alguns compostos presentes no resíduo de uva é essencial para enfatizar a importância do seu uso na prevenção de doenças degenerativas. Portanto, a exposição dos compostos fenólicos em diferentes linhagens celulares é fundamental para avaliar suas propriedades biológicas.

Tabela 1. Avaliação do potencial citotóxico da catequina, quercetina e miricetina em células Raw 264.7, HepG2 e Caco-2.

	Raw 264.7	HepG2	Caco-2
<i>Fenólicos</i>		<u>Viabilidade celular (%)</u>	
Catequina (200 µM)	71,41 ^{aA}	66,12 ^{bA}	72,00 ^{aA}
Quercetina (200 µM)	27,59 ^{cB}	33,96 ^{bB}	56,47 ^{aB}
Miricetina (200 µM)	15,66 ^{cC}	27,03 ^{bC}	51,07 ^{aC}

Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão (n=3). Letras diferentes na mesma linha (minúsculas) representam diferença significativa entre as linhagens. Para cada linhagem, letras diferentes (maiúsculas) representam diferenças significativas entre os fenólicos (teste de Tukey, $p \leq 0,05$). O controle representa 100% de viabilidade celular.

Os flavonóides são investigados por seus efeitos anti-inflamatórios devido a sua ação como inibidores enzimáticos naturais e antioxidantes (MIDDLETON et al., 2000). A biodisponibilidade de flavonóides é quase constante quando consumidos como glicosídeos ou agliconas (ZUBIKet al., 2003). A quercetina apresentou efeito antiproliferativo para a linhagem Raw 264.7 e HepG2, onde a viabilidade celular foi de 27,59 e 33,96% respectivamente. A quercetina é um flavonóide natural encontrado em abundância em quase todos os vegetais e frutas, é considerada um excelente antioxidante, além de ter um efeito pró-apoptótico direto nas células tumorais, bloqueia o crescimento de várias linhagens de células cancerígenas em diferentes fases do ciclo celular humano (GIBELLINI et al., 2011).

Entre os mecanismos prováveis dos efeitos antitumorais da quercetina está a intervenção da via apoptica, a apoptose desempenha um papel crítico na homeostase, desenvolvimento, neoplasia e algumas

doenças degenerativas. Os reguladores da apoptose surgiram como alvos-chave para o desenho de estratégias terapêuticas que modulam as decisões celulares de vida e morte (FISCHER, SCHULZE-OSTHOFF, 2005). A quercetina é dificilmente biodisponível e amplamente transformada em diferentes metabólitos. Embora pouco se saiba sobre suas atividades biológicas, esses metabólitos são importantes para justificar os benefícios a saúde associados à ingestão dietética de quercetina. Os derivados da quercetina presentes na circulação sistêmica podem atuar como potentes agentes antioxidantes e anti-inflamatórios, contribuindo para sua atividade biológica (SERBAN et al., 2016).

Ao realizar o tratamento das linhagens celulares com a miricitina (200 μM) a viabilidade celular da linhagem Raw e HepG2 foi de 15,66 e 27,03% respectivamente. Observou-se que a miricitina apresentou efeito mais nocivo para a linhagem carcinogênica HepG2, resultando em menor viabilidade dessa linhagem após o tratamento. A quercetina e miricitina apresentaram efeito antiproliferativo para a linhagem HepG2 e Raw 264.7 com inibição de mais de 50% da linhagem celular, não obstante, a catequina manteve a viabilidade celular acima de 66% para todas as linhagens avaliadas. A quercetina, miricitina e catequina apresentaram baixo efeito antiproliferativo contra a linhagem Caco-2, pois a viabilidade celular permaneceu acima de 50%. A catequina apresentou baixo efeito antiproliferativo após tratamento das linhagens, no entanto, estudos demonstram que os flavan-3-ol são ativos contra a proliferação de células cancerígenas incluindo linhas celulares de carcinoma do cólon.

É proposto pela literatura que a atividade antiproliferativa da catequina e outros flavonóides provêm da inibição da atividade quinase

de proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular. Os compostos fenólicos individuais (catequina, miricetina e quercetina) apresentaram maior ação antiproliferativa que os resíduos de uva e as frações bioacessíveis. Sugere-se que um fitoquímico específico ou uma classe de fitoquímicos pode ser responsável pela atividade antiproliferativa de determinada matriz.

4. CONCLUSÃO

Os resíduos de uva Isabel e Bordô inibiram a proliferação de células de adenocarcinoma do cólon. A fração bioacessível da uva Isabel (FGI) inibiu a proliferação de células de adenocarcinoma hepático. As frações bioacessíveis fase gástrica e intestinal aumentaram a viabilidade celular da linhagem Raw 264.7, linhagem que apresenta importantes funções de regulação imunológica. A quercetina e miricetina apresentaram alta atividade antiproliferativa quando aplicadas no tratamento da linhagem HepG2 e Raw 264.7. Os resultados sugerem que este resíduo apresenta potencial para ser aplicado no desenvolvimento de alimentos com propriedades funcionais. Mais estudos são necessários para elucidar os componentes específicos presentes no resíduo de uva que são responsáveis pelos efeitos antiproliferativos e quais os mecanismos envolvidos, embora nossos dados suportem a conclusão que a miricetina e quercetina podem ser mediadoras de tais efeitos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Vinícola Poggere por fornecer a matéria-prima. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Agradecemos a Universidade do Vale do Taquari, Laboratório de cultura de Células do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia pela parceria e assistência durante a realização deste trabalho.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo relatou pela primeira vez a composição fenólica individual do resíduo de uva, a bioacessibilidade de seus compostos fenólicos e minerais após simulação gastrointestinal *in vitro* e seu efeito antiproliferativo *in vitro*. Para avaliar o perfil fenólico do resíduo de uva os seguintes parâmetros de extração foram otimizados, a concentração de solvente, proporção sólido:líquido e tempo de extração. Dentre os parâmetros avaliados para otimização do processo de extração, a agitação mecânica orbital apresentou maior eficiência na extração de compostos fenólicos individuais. Os parâmetros otimizados foram utilizados para a extração hidroalcoólica sólido-líquido dos polifenóis na caracterização do resíduo de uva. Os perfis bioativos dos resíduos do processamento do suco de uvas Isabel e Bordô indicaram diferenças na composição polifenólica, como flavanóis, antocianinas, flavonóis e ácidos fenólicos. As abordagens extrativistas propostas neste estudo fornecem subsídios para a reutilização desse resíduo vegetal como alternativa viável para o desenvolvimento de produtos de qualidade com valor agregado.

Para a digestão *in vitro* foi utilizado um modelo padronizado objetivando caracterizar o potencial nutricional e bioativo do resíduo de uva em termos de bioacessibilidade de minerais e de compostos fenólicos. Altos níveis de polifenóis bioacessíveis foram encontrados nas frações bioacessíveis, particularmente na fase gástrica. Os resíduos e suas frações bioacessíveis apresentaram altas concentrações de minerais e compostos fenólicos. Os minerais Ca, Mg, Cu, Fe, Mn, Zn, Al, Sr, Ni e Pb não foram detectados no final da digestão. A variedade de uva

exerceu forte influência nas concentrações de fenólicos durante a passagem gastrointestinal *in vitro*.

Na avaliação da atividade antiproliferativa foi observado que os resíduos de uva Bordô e Isabel inibiram a proliferação de células de adenocarcinoma do cólon. Ao avaliar a atividade citotóxica, a quercetina e miricitina demonstraram alta atividade antiproliferativa após o tratamento da linhagem HepG2. Estes resultados demonstram que o resíduo de uva apresenta potencial antiproliferativo contra linhagens carcinogênicas, no entanto mais estudos devem ser realizados para avaliar os mecanismos envolvidos nessa ação antiproliferativa, além de avaliar o efeito anti-inflamatório desta matriz.

Neste estudo foi comprovado que o resíduo obtido da centrifugação do suco érico em compostos fenólicos de diferentes classes, como flavanois e antocianinas. A catequina e epicatequina estão presentes em altas concentrações no resíduo de uva Isabel e Bordô, bem como as antocianinas malvidina-3-*O*-glicosídeo e malvidina-3,5-diglicosídeo. Os compostos fenólicos do resíduo de uva da variedade Bordô apresentou altos índices de bioacessibilidade. O resíduo de uva apresentou potencial antiproliferativo contra linhagens carcinogênicas. Os resultados deste estudo sustentam que o resíduo de uva apresenta potencial para ser utilizado no desenvolvimento de produtos com propriedades funcionais e nutracêuticas.

REFERÊNCIAS

ANASTASIADI, M.; PRATSINIS, H.; KLETSAS, D.; SKALTSOUNIS, ALEXIOS-LEANDROS, HAROUTOUNIAN, S. A. Bioactive non-coloured polyphenols content of grapes, wines and vinification by-products: Evaluation of the antioxidant activities of their extracts. **Food Research International**, v. 43, p. 805-813, 2010.

ANASTASIADI, M.; PRATSINIS, H.; KLETSAS, D.; SKALTSOUNIS, A. L.; HAROUTOUNIAN, S. A. Grape stem extracts: polyphenolic content and assessment of their *in vitro* antioxidant properties. **Food Science and Technology**, v.48, p. 316–322, 2012.

ANDRES-LACUEVA, C.; SHUKITT-HALE, B.; GALLI, R. L.; JAUREGUI, O.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M.; JOSEPH, J. A. Anthocyanins in aged blueberry-fed rats are found centrally and may enhance memory. **Nutritional Neuroscience**, v. 8, p. 111-20, 2005.

ARNOUS, A.; MEYER, A. S. Quantitative prediction of cell wall polysaccharide composition in grape (*Vitis vinifera* L.) and apple (*Malus domestica*) skins from acid hydrolysis monosaccharide profiles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, p.3611-9, 2009.

ATCC. Manassas - USA: **Product Information Sheet for ATCCHB-8065**; 2012.

BALIMANE, P. V.; CHONG, S.; MORRISON, R. A. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. **Journal of Pharmacology and Toxicology**, v.44, p. 301-312, 2000.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191-203, 2006.

BARNABÉ, D.; VENTURINI, W. G.; BOLINI, H. M. A. Análise descritiva quantitativa de vinhos produzidos com uvas Niágara Rosada e Bordô. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 10, n. 2, p. 122-129, 2007.

BORDIGNON-LUIZ, M. T.; GAUCHE, C.; GRIS, E. F.; FALCÃO, L. D. Colour stability of anthocyanins from Isabel grapes (*Vitis labrusca* L.) in model systems. **LWT - Food Science and Technology**, v.40, n. 4, p.594–599, 2007.

BOSO, S.; ALONSO-VILLAVARDE, V.; GAGO, P.; SANTIAGO, J. L. MARTÍNEZ, M. C. Susceptibility to downy mildew (*Plasmopara viticola*) of different *Vitis* varieties. **Crop Protection**, v.63, p.26-35, 2014.

BOOTS, A.W.; HAENEN, G. R. M. M.; BAST, A. Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. **European Journal of Pharmacology**, v. 585, p. 325-337, 2008.

BOCKERSTETT, K. A.; DIPAOLO, R. J. Regulation of gastric carcinogenesis by inflammatory cytokines. **Cellular and Molecular Gastro enterology and Hepatology**, v. 4, p. 47-53, 2017.

BORNSCHEIN, J. et al. H. pylori Infection Is a Key Risk Factor for Proximal Gastric Cancer. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 55, n. 11, p. 3124–3131, 29 nov. 2010.

BRENES, A., VIVEROS, A., CHAMORRO, S., ARIJA, I. Use of polyphenol-rich grape byproduct in monogastric nutrition. A review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 211, p.1-17, 2016.

BRASIL. Lei nº 7.678, de 8 de novembro de 1988. Dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 8 nov. 1988.

BRASIL. Portaria nº 55, de 27 de julho de 2004. Normas referentes à complementação dos padrões de identidade e qualidade do vinho e dos derivados da uva e do vinho. **Diário Oficial da União**, Brasília, 30 jul. 2004.

BRASIL. Ministério de Saúde. **ABC do câncer- Abordagens básicas para o controle do câncer**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2011.

BRASIL. Ministério de Saúde. **Instituto Nacional do Câncer (Inca). Estimativa 2016-Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2015.

BRASIL. Ministério de Saúde. Instituto Nacional de Câncer (INCA). **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil**. Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro: INCA, 2017.

BRAY, F.; REN, J.-S.; MASUYER, E.; FERLAY, J. Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. **International Journal of Cancer**, v. 132 (5), p. 1133–1145, 2013.

BURIN, V. M.; FERREIRA-LIMA, N. E.; PANCERI, C. P.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Bioactive compounds and antioxidant activity of *Vitis vinifera* and *Vitis labrusca* grapes: Evaluation of different extraction methods. **Microchemical Journal**, v.114, p.155-163, 2014.

CADOT, Y.; CAILLÉ, S.; THIOULET-SCHOLTUS, M.; SAMSON, A.; BARBEAU, G.; CHEYNIER, V. Characterisation of typicality for wines related to terroir by conceptual and by perceptual representations. An application to red wines from the Loire Valley. **Food Quality and Preference**, v.24, p.48–58, 2012.

CANIZO, B.V.; ESCUDERO, L. B.; PÉREZ, M. B.; PELLERANO, R. G.; WUILLOUD, R.G. Intra-regional classification of grape seeds produced in Mendoza province (Argentina) by multi-elemental analysis and chemometrics tools. **Food Chemistry**, v. 242, p. 272–278, 2018.

CAMARGO, U. A. **Porta-enxertos e cultivares de videira**. Bento Gonçalves: EMBRAPA Uva e Vinho, 2008.

CAMARGO, U. A.; MAIA, J. D. G.; RITSCHHEL, P. S. **Novas cultivares brasileiras de uva**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2010.

CAMPOS, E. M. F.; ROGONI, T. T.; MASSOCATTO, C. L.; DINIZ, K. M.; CAETANO, J.; DRAGUNSKI, D. C. Quantificação de minerais em sucos industrializados. **Arquivos de Ciência da Saúde**, v.14, n. 1, p. 11-16, 2010.

CARBONELL-CAPELLA, J. M.; BARBA, F. J.; ESTEVE, M. J.; FRÍGOLA, A. Quality parameters: bioactive compounds and their correlation with antioxidant capacity of commercial fruit based baby foods. **Food Science and Technology International**, v. 20, p.479–487, 2014.

CARBONELL-CAPELLA, J. M.; BUNIOWSKA, M.; ESTEVE, M. J.; FRIGOLA, A. Effect of Stevia rebaudiana addition on bioaccessibility of bioactive compounds and antioxidant activity of beverages based on exotic fruits mixed with oat following simulated human digestion. **Food Chemistry**, v. 184, p. 122–130, 2015.

CHIRA, K.; SUH, J. H.; SAUCIER, C.; TEISSÈDRE, P. L. Les polyphénols du raisin. **Phytothérapie**, v. 6, p. 75-82, 2008.

CHOI, Y., LEE, J. Antioxidant and antiproliferative properties of a tocotrienol-rich fraction from grape seeds. **Food Chemistry**, v. 114, p.1386-1390, 2009.

CILLA, A.; GONZÁLEZ-SARRÍAS, A.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; ESPÍN, J. C.; BARBERÁ, R. Availability of polyphenols in fruit beverages subjected to *in vitro* gastrointestinal digestion and their effects on proliferation, cell-cycle and apoptosis in human colon cancer Caco-2 cells. **Food Chemistry**, v.114, p.813-820, 2009.

CROSBY, K.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; BYRNE, H. D.; BOONPRAKOB, U.; THAIPONG, K. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 669-675, 2006.

DANI, C.; OLIBONI, L. S.; VANDERLINDE, R.; BONATTO, D.; SALVADOR, M.; HENRIQUES, J. A. P. Phenolic content and antioxidant activities of white and purple juices manufactured with organically or conventionally produced grapes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 2574-2580, 2007.

DANI, C.; OLIBONI, L. S.; PASQUALI, M. A. B.; OLIVEIRA, M. R.; UMEZU, F. M.; SALVADOR, M.; MOREIRA, J. C. F.; HENRIQUES, J. A. Intake of purple juice a hepatoprotective agent in Wistar rats. **Journal of Medicinal Food**, v. 11, p. 127-132, 2008.

DAVIDOV-PARDO, G.; MCCLEMENTS, D.J. Nutraceutical delivery systems: Resveratrol encapsulation in grape seed oil nanoemulsions formed by spontaneous emulsification. **Food Chemistry**, v. 167, p. 205–212, 2015.

DEVESA-REY, R.; VECINO, X.; VARELA-ALENDE, J. L.; BARRAL, M. T.; CRUZ, J. M.; MOLDES, A. B. Valorization of winery wastes vs. The cost of not recycling. **Waste Manage**, v. 31, p. 2327–2335, 2011.

DE LIMA, A. C. S.; DA ROCHA VIANA, J. D.; DE SOUSA SABINO, L. B.; DA SILVA, L. M. R.; DA SILVA, N. K. V.; DE SOUSA, P. H. M. Processing of three different cooking methods of cassava: Effects on *in vitro* bioaccessibility of phenolic compounds and antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 76, p. 253–258, 2017.

DE CAMARGO, A. C.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; BIASOTO, A. C. T.; SHAHIDI, F. Low molecular weight phenolics of grape juice and winemaking byproducts: Antioxidant activities and inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein cholesterol and DNA strand breakage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 12159–12171, 2014.

DINICOLA, S. et al. Antiproliferative and apoptotic effects triggered by Grape Seed Extract (GSE) versus epigallocatechin and procyanidins on colon cancer cell lines. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 651–664, 2012.

DOMÍNGUEZ-PERLES, R.; GUEDES, A.; QUEIROZ, M.; SILVA, A. M.; BARROS, A. I. R. N. A. Oxidative stress prevention and anti-apoptosis activity of grape (*Vitis vinifera* L.) stems in human keratinocytes. **Food Research International**, v. 87, p. 92–102, 2016.

EDELIN, J. et al. Systemic chemotherapy for hepatocellular carcinoma in noncirrhotic liver: a retrospective study. **World Journal of Gastroenterology**, [S.l.], v. 15, p. 713-716, 2009.

ESLICK, G. D. Helicobacter pylori infection causes gastric cancer? A review of the epidemiological, meta-analytic, and experimental evidence. **World Journal of Gastroenterology**, v. 12, p. 2991–2999, 2006.

EILAT-ADAR, S.; SINAI, T.; YOSEFY, C.; HENKIN, Y. Nutritional recommendations for cardiovascular disease prevention. **Nutrients**, v. 5, p. 3646- 3683, 2013.

FABIANI, R.; ROSIGNOLI, P.; DE BARTOLOMEO, A.; FUCCELLI, R.; SERVILI, M.; MOROZZI, G. The production of hydrogen peroxide is not a common mechanism by which olive oil phenols induce apoptosis on HL60 cells. **Food Chemistry**, v. 125 (4), p. 1249–1255, 2011.

FAN, G. J.; JIN, X. L.; QIAN, Y. P.; WANG, Q.; YANG, R. T.; DAI, F.; et al. Hydroxycinnamic acids as DNA-cleaving agents in the presence of Cu-II ions: Mechanism, structure–activity relationship, and biological implications. **Chemistry – A European Journal**, v. 15, p. 12889–12899, 2009.

FANG, Z.; TAO, W.; BOLIN, Z.; HONGFEI, Z. Addition of sucrose during the blueberry heating process is good or bad? Evaluating the changes of anthocyanins/anthocyanidins and the anticancerability in HepG-2 cells. **Food Research International**, v. 107, p. 509–51, 2018.

FISCHER, U.; SCHULZE-OSTHOFF, K. New approaches and therapeutics targeting apoptosis in disease. **Pharmacological Reviews**, v. 57, p. 187-215, 2005.

FERRARS, R. M.; CZANK, C.; ZHANG, Q.; BOTTING, N. P.; KROON, P. A.; CASSIDY, A.; KAY, C. D. The pharmacokinetics of anthocyanins and their metabolites in humans. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, p. 3268 – 3282, 2014.

FERNANDES, I.; FARIA, A.; AZEVEDO, J.; SOARES, S.; CALHAU, C.; DE FREITAS, V., et al. Influence of anthocyanins, derivative pigments and other catechol and pyrogallol-type phenolics on breast cancer cell proliferation. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 58 (6), p. 3785–3792, 2010.

FERNÁNDEZ-MAR, M. I.; MATEOS, R.; GARCÍA-PARRILLA, M. C.; PUERTAS, B.; CANTOS-VILLAR, E. Bioactive compounds in wine: Resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: A review. **Food Chemistry**, v. 130, p. 797-813, 2012.

FRAGA, C. G.; OTEIZA, P. I. Dietary flavonoids: Role of (-)-epicatechin and related procyanidins in cell signaling. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, p. 813-823, 2011.

FRESHNEY, I. R. **Culture of animal cells. A manual of Basic Technique**. 5 ed. New York: WileyLiss, 2005.

FU, L.; XU, B. T.; XU, X. R.; GAN, R. Y.; ZHANG, Y.; XIA, E. Q.; LI, H. B. Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. **Food Chemistry**, v. 129, p. 345-350, 2011.

GALLUZI, L.; MAIURIL, M. C.; VITALE, I.; ZISCHKA, H.; CASTEDO, M.; ZITVOGEL, L.; KROEMER, G. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. **Cell Death and Differentiation**, v. 12, p. 1237-1243, 2007.

GARCIA-PEREZ, J. V.; GARCÍA-ALVARADO, M. A.; CARCEL, J. A.; MULET, A. Extraction kinetics modeling of antioxidants from grape stalk (*Vitis vinifera* var. Bobal): influence of drying conditions. **Journal of Food Engineering**, v. 101, p. 49-58, 2010.

GARRIDO, J.; BORGES, F. Wine and grape polyphenols - A chemical perspective. **Food Research International**, v. 54, p. 1844-1858, 2013.

GEE, J. M.; HARA, H.; JOHNSON, I. T. Suppression of intestinal crypt cell proliferation and aberrant crypt foci by dietary quercetin in rats. **Nutrition and Cancer**, v. 43, p. 193-201, 2002.

GIBELLINI, L.; PINTI, M.; NASI, M.; MOTAGNA, J.; DE BIASI, S.; ROAT, E.; BERTONCELLI, L.; COOPER, E.; COSSARIZZA, A. Quercetin and cancer chemoprevention. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1-15, 2011.

GÓMEZ-ALONSO, S.; GARCÍA-ROMERO, E.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. HPLC analysis of diverse grape and wine phenolics using direct injection and multidetection by DAD and fluorescence. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, p. 618-626, 2007.

GONZÁLEZ-ARIAS, C. A.; MARÍN, S.; SANCHIS, V.; RAMOS, A. J. Mycotoxin Bioaccessibility/absorption assessment using *in vitro* digestion models: **A review. World Mycotoxin Journal**, v. 6, p. 167-184, 2013.

GONZÁLEZ-CENTENO, M. R.; JOURDES, M.; FEMENIA, A.; SIMAL, S.; ROSSELLI, C.; TEISSEDRE, P. L. Proanthocyanidin composition and antioxidant potential of the stem winemaking byproducts from 10 different grape varieties (*Vitis vinifera* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 11850–11858, 2012.

GONZÁLEZ-CENTENO, M. R.; ROSSELLÓ, C.; SIMAL, S.; GARAU, M. C.; LÓPEZ, F.; FEMENIA, A. Physico-chemical properties of cell wall material obtained from ten grape varieties and their byproducts: grape pomaces and stems. **LWT- Food Science and Technology**, v. 43, p. 1580–1586, 2010.

GUERRA, A.; ETIENNE-MESMIN, L.; LIVRELLI, V.; DENIS, S.; BLANQUET-DIOT, S.; ALRIC, M. Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 11, p. 591-600, 2012.

HAAS, I. C. S. Resíduo obtido do processamento do suco de uva: Caracterização e cinética de secagem. 2015. 124 f. **Dissertação** (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

HAAS, I. C. S.; TOALDO, I. M.; DE GOIS, J. S.; BORGES, D. L. G.; PETKOWICZ, C. L. O.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Phytochemicals, Monosaccharides and Elemental Composition of the Non-Pomace Constituent of Organic and Conventional Grape Juices (*Vitis labrusca* L.): Effect of Drying on the Bioactive Content. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 71, p. 422-428, 2016.

HAAS, I. C. S.; TOALDO, I. M.; BURIN, V. M.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Extraction optimization for polyphenolic profiling and bioactive enrichment of extractives of non-pomace residue from grape processing. **Industrial Crops and Products**, v. 112, p. 593-601, 2018.

- HAAS, I. C. S.; TOALDO, I. M.; GOMES, T. M.; LUNA, A. S.; DE GOIS, J. S.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Polyphenolic profile, macro- and microelements in bioaccessible fractions of grape juice sediment using *in vitro* gastrointestinal simulation. **Food Bioscience**, v.27, p. 66-74, 2019.
- HASHIM, Y. Z. H. Y.; ROWLAND, I. R.; MCGLYNN, H.; SERVILI, M.; SELVAGGINI, R.; TATICCHI, A.; et al. Inhibitory effects of olive oil phenolics on invasion in human colon adenocarcinoma cells *in vitro*. **International Journal of Cancer**, v. 122, p. 495–500, 2008.
- HE, X.; LIU, R. H. Phytochemicals of apple peels: Isolation, structure elucidation, and their anti-proliferative and antioxidant activities. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 56, p. 9905–9910, 2008.
- HEANEY, R. P. Factors influencing the measurement of bioavailability, taking calcium as a model. **The Journal of Nutrition**, v. 131, p. 1344–8, 2001.
- HEMERYCK, L. Y.; ROMBOUTS, C.; HECKE, T. V.; MEULEBROEK, L. V.; BUSSCHE, J. V.; SMET, S.; VANHAECKE, L. *In vitro* DNA adduct profiling to mechanistically link red meat consumption to colon cancer promotion. **Toxicology Research**, v. 5, p. 1346–1358, 2016.
- HIDALGO, I. J.; RAUB, T. J.; BORCHARDT, R.T.Characterization of the Human Colon Carcinoma Cell Line (Caco-2) as a Model System for Intestinal Epithelial Permeability.**Gastroenterology**, v. 96, p. 736-749, 1989.
- HO, H. H.; CHANG, C.-S.; HO, W.-C.; LIAO, S.-Y.; WU, C.-H.; WANG, C.-J. Antimetastasis effects of gallic acid on gastric cancer cells involves inhibition of NFkappaB activity and downregulation of PI3K/AKT/small GTPase signals.**Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 2508–2516, 2010.
- HOLLMAN, P. C. H.; ARTS, I. C. W. Flavonols, flavones and flavanols – nature, occurrence and dietary burden.**Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 1081-1093, 2000.

HOUGHTON, P.; FANG, R.; TECHATANAWAT, I.; STEVENTON, G.; HYLANDS, P. J.; LEE, C. C. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. **Methods**, v. 42, p. 377-387, 2007.

HWANG, H.; DWYER, J.; RUSSELL, R. M. Diet, *Helicobacter pylori* infection, food preservation and gastric cancer risk: are there new roles for preventative factors? **Nutrition reviews**, v. 52, n. 3, p. 75-83, 1994.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil**. Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro: INCA, 2017.

IRIGARAY, P.; BELPOMME, D. Basic properties and molecular mechanisms of exogenous chemical carcinogens. **Carcinogenesis**, v. 31, p. 135-148, 2010.

ISERI, L. T.; FRENCH, J. H. Magnesium- natures's physiologic calcium blocker. **American Heart Journal**, v. 108, p. 188-193, 1984.

JACKSON, R. S. **Wine Science – Principles and Applications**. London, UK. 3ed. Academic Press, p. 789, 2008.

JARA-PALACIOS, M. J.; HERNANZ, D.; CIFUENTES-GOMEZ, T.; ESCUDERO-GILETE, T.; ESCUDERO-GILETE, M. L.; HEREDIA, F. J.; SPENCER, J. P. E. Assessment of white grape pomace from winemaking as source of bioactive compounds, and its antiproliferative activity. **Food Chemistry**, v. 183, p. 78-82, 2015.

JAYAPRAKASHA, G. K.; SELVI, T.; SAKARIAH, K. K. Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. **Food Research International**, v. 36, p. 117-122, 2003.

JEONG, C. H.; KWAK, J. H.; KIM, J. H.; CHOI, G. N.; KIM, D. O.; HEO, H. J. Neuronal cell protective and antioxidant effects of phenolics obtained from *Zanthoxylum piperitum* leaf using *in vitro* model system. **Food Chemistry**, v. 125, p. 417-422, 2011.

JERNAL, A.; BRAY F.; CENTER M. M.; FERLAY, J.; WARD, E.; FORMAN, D. Global cancer statistics. **A Cancer Journal for Clinicians**, v. 61, p. 69-90, 2011.

KELLY, J. J.; ALBERTS, S. R.; SACCO, F.; LANIER, A. P. Colorectal cancer in Alaska Native People, 2005–2009. **Gastrointestinal Cancer Research**, v. 5, p. 149–154, 2012.

KICH, D. M.; BITENCOURT, S.; ALVES, C.; SILVA, J.; PINTEUS, S.; PEDROSA, R.; LAUFER, S.; SOUZA, C. F. V.; GOETTERT. Neuromodulatory effects of *Calyptanthes grandifolia* extracts against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 84, p. 382–386, 2016.

LEE, S. Y. H.; MUNEROL, B.; POLLARD, S.; YOUNG, K. A.; PANNALA, A. S.; KUHNLE, G. G.; DEBNAM, E. S.; REICE-EVANS, C.; SPENCER, J. P. The reaction of flavanols with nitrous acid protects against N-nitrosamine formation and leads to the formation of nitroso derivatives which inhibit cancer cell growth. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 40, p. 323–334, 2006.

LEE, J. H. et al. Current Management and Future Strategies of Gastric Cancer. **Yonsei Medical Journal**, v. 53, n. 2, p. 248, 2012.

LEE, H. S.; CHO, H. J.; YU, R.; LEE, K. W.; CHUN, H. S.; PARK, J. H. Y. Mechanisms underlying apoptosis- inducing effects of kaempferol in HT-29 human colon cancer cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, p. 2722–2737, 2014.

LEENDERS, M. et al. Subtypes of fruit and vegetables, variety in consumption and risk of colon and rectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. **International Journal of Cancer**, v. 137, p. 2705–2714, 2015.

VOGTMANN, E. et al. Fruit and vegetable intake and the risk of colorectal cancer: Results from the Shanghai Men's Health Study. **Cancer Causes & Control**, v. 24, p. 1935–1945, 2013.

LEIFERT, W. R.; ABEYWARDENA, M. Y. Cardioprotective actions of grape polyphenols. **Nutrition Research**, v. 28, p. 729–737, 2008.

LEMBERKOVICS, E.; CZINNER, E.; SZENTMIHÁLYI, K.; BALÁZS, A.; SZÓKE, E. Comparative evaluation of *Helichrysis flos* herbal extracts as dietary sources of plant polyphenols, and macro- and microelements. **Food Chemistry**, v. 78., n. 1., p. 119-127, 2002.

LIU, X. L.; ZHAO, M. M.; WU, K. G.; CHAI, X. H.; YU, H. P.; TAO, Z. H.; et al. Immunomodulatory and anticancer activities of phenolics from emblica fruit (*Phyllanthus emblica* L.). **Food Chemistry**, v. 131, p. 685–690, 2012.

LUO, W.; ZHAO, M.; YANG, B.; REN, J.; SHEN, G.; RAO, G. Antioxidant and antiproliferative capacities of phenolics purified from *Phyllanthus emblica* L. fruit. **Food Chemistry**, v. 126, p. 277–282, 2011.

MAIA, J. D. G.; CAMARGO, U. A. Sistema de Produção de Uvas Rústicas para Processamento em Regiões Tropicais do Brasil. **Embrapa Uva e Vinho Sistema de Produção**, 9 ISSN 1678-8761, 2005.

MAKRIS, D. P.; BOSKOU, G.; ANDRIKOPOULOS, N. K. Polyphenolic content and *in vitro* antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.20, p.125–132, 2007.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727-747, 2004.

MARINOVA, E. M.; YANISHLIEVA, N. V. Antioxidant activity and mechanism of action of some phenolic acids at ambient and high temperatures. **Food Chemistry**, v. 81, p. 189-197, 2003.

MATTIVI, F.; FERREIRA, A. E.; VRHOVSEK, U.; PEDROSA, C. R., BORDIGNON-LUÍS, M. T.; GRIS, F. E. Proanthocyanidin profile and antioxidant capacity of Brazilian *Vitis vinifera* red wines. **Food Chemistry**, v. 126, p. 213-220, 2011.

MELLO, J. C. A.; VILLAS-BOAS, R. L.; LIMA, E. V.; CRUSCIOL, C. A.C.; BÜLL, L. T. Alterações nos atributos químicos de um Latossolo Distroférrico decorrentes da granulometria e doses de calcário em sistemas plantio direto e convencional. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 27, p. 553-561, 2003.

MELLO, L. M. R. **Vitivinicultura brasileira: panorama 2011**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2011.

MELLO, L. M. R. **Desempenho da vitivinicultura brasileira em 2015**. Bento Gonçalves: EMBRAPA Uva e Vinho, 2016.

MELLO, L. M. R. **Panorama da produção de uvas e vinhos no Brasil**. CAMPO & NEGÓCIOS, 2017.

MELO, P. S.; ARRIVETTI, L. O. R.; ALENCAR, S. M.; SKIBSTED, L. H. Antioxidative and prooxidative effects in food lipids and synergism with α -tocopherol of açai seed extracts and grape rachis extracts. **Food Chemistry**, v. 213, p. 440–449, 2016.

MENG, JIANG-FEI.; FANG, YU-LIN.; QIN, MIN-YANG.; ZHUANG, XI-FU.; ZHANG, ZHEN-WEN. Varietal differences among the phenolic profiles and antioxidant properties of four cultivars of spine grape (*Vitis davidii* Foex) in Chongyi County (China). **Food Chemistry**, v. 134, p. 2049–2056, 2012.

MÉNARD, O.; CATTENOZ, T.; GUILLEMIN, H.; SOUCHON, I.; DEGLAIRE, A.; DUPONT, D.; PICQUE, D. Validation of a new *in vitro* dynamic system to simulate infant digestion. **Food Chemistry**, v. 145, p. 1039-1045, 2014.

McDOUGALL, G. J.; DOBSON, P.; SMITH, P.; BLAKE, A.; STEWART, D. Assessing potential bioavailability of raspberry anthocyanins using an *in vitro* digestion system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 5896-5904, 2005.

MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological Reviews**, v. 52, p. 673-751, 2000.

MINEKUS et al. A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus. **Food Functional**, v. 5, p. 1113–1124, 2014.

MIRONEASA, S.; LEAHU, A.; CODINĂ, G.; STROE, S.; MIRONEASA, C. Grape seed: physico-chemical, structural characteristics and oil content. **Journal of Agroalimentary Processes and Technologies**, v. 16, p. 1–6, 2010.

MONAGAS, M.; SUÁREZ, R.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C.; BARTOLOMÉ, B. Simultaneous determination of nonanthocyanin phenolic compounds in red wine by HPLC-DAD/ESI-MS. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 56, p. 139–147, 2005.

MORENO-ARRIBAS, M. V.; POLO, M. C. **Wine Chemistry and Biochemistry**. Springer Science, New York, USA, 2009.

MOSELE, J. I.; MACIÁ, A.; ROMERO, M. P.; MOTILVA, M. J. Stability and metabolism of *Arbutus unedo* bioactive compounds (phenolics and antioxidants) under *in vitro* digestion and colonic fermentation. **Food Chemistry**, v. 201, p. 120–130, 2016.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55–63, 1983.

NERANTZIS, E. T.; TATARIDIS, P. Integrated enology – utilization of winery wastes for the production of high added value products. **Journal of Science and Technology**, v. 1, p. 79–89, 2006.

NERI-NUMA, I. A.; CARVALHO-SILVA, L. B.; MORALES, J. P.; MALTA, L. G.; MURAMOTO, M. T.; FERREIRA, J. E. M.; CARVALHO, J. E.; RUIZ, A. T. G.; MARÓSTICA JUNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. Evaluation of the antioxidant, antiproliferative and antimutagenic potential of araçá-boi fruit (*Eugenia stipitata* Mc Vaughn — Myrtaceae) of the Brazilian Amazon Forest. **Food Research International**, v. 50, p. 70–76, 2013.

NIXDORF, S. L.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. Brazilian red wines made from the hybrid grape cultivar Isabel: Phenolic composition and antioxidant capacity. **Analytica Chimica Acta**, v. 659, p. 208–215, 2010.

NUNES, M. A.; PIMENTEL, F.; COSTA, A. S. G.; ALVES, R. C.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Cardioprotective properties of grape seed proanthocyanidins: An update. **Trends in Food Science & Technology**, v. 57, p. 31-39, 2016.

OLIVEIRA, P. A.; COLAÇO, A.; CHAVES, R.; GUEDES-PINTO, H.; DE-LA-CRUZ, P. L. F.; LOPES, C. **Chemical carcinogenesis. Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 79, n. 4, p. 593-616, 2007.

PANCERI, C. P.; GOMES, T. M.; DE GOIS, J. S.; BORGES, D. L.G.; BORDIGNON-LUIZ, M.T. Effect of dehydration process on mineral content, phenolic compounds and antioxidant activity of Cabernet Sauvignon and Merlot grapes. **Food Research International**, v. 54, p. 1343–1350, 2013.

PANCERI, C. P.; DE GOIS, J. S.; BORGES, D. L. G.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Effect of grape dehydration under controlled conditions on chemical composition and sensory characteristics of Cabernet Sauvignon and Merlot wines. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 228-235, 2015.

PARKIN, D. M. et al. Global cancer statistics, 2002. **A cancer journal for clinicians**, v. 55, n. 2, p. 74-108, 2005.

PENNA, L. S. Análise de novos agentes quimioterápicos em linhagens celulares de câncer gástrico humano. 2017. 131 f. **Tese de doutorado**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.

PEIXOTO, C. M.; DIAS, M. I.; ALVES, M. J.; CALHELHA, R. C.; BARROS, L.; PINHO, S. P.; FERREIRA, I. C. F. R. Grape pomace as a source of phenolic compounds and diverse bioactive properties. **Food Chemistry**, v. 253, n. 1, p. 132-138, 2018.

PERDUE, D. G.; HAVERKAMP, D.; PERKINS, C.; DALEY, C. M.; PROVOST, E. Geographic variation in colorectal cancer incidence and mortality, age of onset, and stage at diagnosis among American Indian and Alaska Native people, 1990–2009. **American Journal of Public Health**, v. 104, p. S404–S414, 2014.

PRIEUR, C.; RIGAUD, J.; CHEYNIER, V.; MOUTOUNET, M.
Oligomeric and polymeric procyanidins from grape
seeds. **Phytochemistry**, v. 36, p. 781-784, 1994.

PROTAS, J. F. S.; CAMARGO, U. A. **Vitivinicultura Brasileira: Panorama Setorial de 2010**. Brasília: SEBRAE; Bento Gonçalves: IBRAVIN: Embrapa Uva e Vinho, 2011.

PUJOL, D.; LIU, C.; FIOL, N.; OLIVELLA, A.; GOMINHO, J.;
VILLAESCUSA, I.; PEREIRA, H. Chemical characterization of
different granulometric fractions of grape stalks waste. **Industrial
Crops and Products**, v. 50, p. 494–500, 2013.

RAMOS, S.; RODRÍGUEZ-RAMIRO, I.; MARTÍN, M. A.; GOYA, L.;
BRAVO, L. Dietary flavanols exert different effects on antioxidant
defenses and apoptosis/proliferation in Caco-2 and SW480 colon cancer
cells. **Toxicology in vitro**, v. 25, p. 1771–1781, 2011.

REIN, M. J.; RENOUF, M.; CRUZ-HERNANDEZ, C.; ACTIS-
GORETTA, L.; THAKKAR, S. K.; DA SILVA PINTO, M.
Bioavailability of bioactive food compounds: A challenging journey to
bioefficacy. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 75, p. 588-
602, 2013.

RIBÉREAU-GAYON, P.; DUBOURDIEU, D.; DONÉCHE, B.;
LONVAUD, A. **Handbook of Enology: the microbiology of wine and
vinifications**. 2ed. Wiley & Sons, p. 429, 2006.

RIMM, E. B. Fruit and vegetables: building a solid foundation.
American Journal of Clinical Nutrition, v. 76, n. 1, p.1-2, 2002.

RIZZON, L. A.; MANFROI, V.; MENEGUZZO, J. **Elaboração de
suco de uva na propriedade vitícola**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva
e Vinho, p. 24, 1998.

RIZZON, L.A.; MENEGUZZO, J. **Suco de uva**. Brasília: Embrapa
Informação Tecnológica, 2007.

ROCKENBACH, I. I.; JUNGFER, E.; RITTER, C.; SANTIAGO-SCHÜBEL, B.; THIELE, B.; FETT, R.; GALENSA, R.

Characterization of flavan-3-ols in seeds of grape pomace by CE, HPLC-DAD-MSⁿ and LC-ESI-FTICR-MS. **Food Research International**, v. 48, p. 848–855, 2012.

RONDEAU, P.; GAMBIER, F.; JOLIBERT, F.; BROSSE, N.

Compositions and chemical variability of grape pomaces from French vineyard. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 251–254, 2013.

RUIZ-MORENO, M. J.; RAPOSO, R.; CAYUELA, J. M.; ZAFRILLA, P.; PIÑEIRO, Z.; MORENO-ROJAS, J. M.; MULERO, J.; PUERTAS, B.; GIRON, F.; GUERRERO, R.F.; CANTOS-VILLAR, E.

Valorization of grape stems. **Industrial Crops and Products**, v. 63, p. 152-157, 2015.

SÁEZ, V.; PASTENE, E.; VERGARA, C.; MARDONES, C.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I.; GÓMEZ-ALONSO, S.; GÓMEZ, M. V.; THEODULOZ, C.; RIQUELME, S.; BAER, D. Oligostilbenoids in *Vitis vinifera* L. Pinot Noir grape cane extract: Isolation, characterization, *in vitro* antioxidant capacity and anti-proliferative effect on cancer cells. **Food Chemistry**, v. 265, p. 101–110, 2018.

SAHPAZIDOU, D.; GEROMICHALOS, G. D.; STAGOS, D.; APOSTOLOU, A.; HAROUTOUNIAN, S. A.; TSATSAKIS, A. M.; TZANAKAKIS, G. N.; HAYES, A. W.; KOURETAS, D.

Anticarcinogenic activity of polyphenolic extracts from grape stems against breast, colon, renal and thyroid cancer cells. **Toxicology Letters**, v. 230, p. 218–224, 2014.

SANTANA, M. T. A. Caracterização físico-química, química e sensorial de frutos e vinhos de cv. Patrícia (*Vitis labrusca* L.).

Dissertação de mestrado (Ciência dos Alimentos), Universidade Federal de Lavras, 2005.

SAURA-CALIXTO, F.; SERRANO, J.; GOÑI, I. Intake and

bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. **Food Chemistry**, v. 101, p. 492–501, 2007.

SERBAN, M. C.; SAHEBKAR, A.; ZANCHETTI, A.; MIKHAILIDIS, D. P.; HOWARD, G.; ANTAL, D.; ANDRICA, F.; AHMED, A.;

ARONOW, W. S.; MUNTNER, P.; LIP, G. Y.; GRAHAM, I.; WONG, N.; RYSZ, J.; BANACH, M. Effects of Quercetin on Blood Pressure: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. **Journal of the American Heart Association**, v. 5, 2016.

SCHWARTZ, S. J.; VONELBEE, J. H.; GIUSTI, M. M. Corantes. In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4 Ed. Porto Alegre: Artmed, p. 445-498, 2010.

SHI, J.; YU, J.; POHORLY, J. E.; KAKUDA, Y. Polyphenolics in grape seeds biochemistry and functionality. **Journal of Medicinal Food**, v. 6, p. 291–299, 2003.

SIGNORELLI, P.; GHIDONI, R. Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises. **Journal of nutritional biochemistry**, v. 16, p. 449-66, 2005.

SIGNORELLI, P. et al. Natural grape extracts regulate colon cancer cells malignancy. **Nutrition and Cancer-An International Journal**, v. 67, p. 494–503, 2015.

SRINI SRINIVASAN, V. Bioavailability of Nutrients: A Practical Approach to *In Vitro* Demonstration of the Availability of Nutrients in Multivitamin-Mineral Combination Products. **The Journal of Nutrition**, v. 131, p. 1349S–1350S, 2001.

SOMERS, T. C.; VÉRETTE, E.; POCOCK, K. F. Hydroxycinnamate esters of *Vitis vinifera*: Changes during white vinification, and effects of exogenous enzymatic hydrolysis. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 40, p. 67-78, 1987.

SÔNEGO, O. R.; GARRIDO, L. da R.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A. **Principais doenças fúngicas da videira no Sul do Brasil**. Bento Gonçalves: Embrapa CNPUV, 2005.

STRATTON, M. R.; CAMPBELL, P. J.; FUTREAL, A. The cancer genome. **Nature**, v. 458, p. 719-724, 2009.

TAKAHASHI, R.; ONO, K.; TAKAMURA, Y.; MIZUGUCHI, M.; IKEDA, T.; NISHIJO, H.; YAMADA, M. Phenolic compounds prevent the oligomerization of α -synuclein and reduce synaptic toxicity. **Journal of Neurochemistry**, v. 134, p. 943-55, 2015.

TAO, J.; LI, Y.; LI, S.; LI, HUA-BIN. Plant foods for the prevention and management of colon cancer. **Journal of Functional Foods**, v. 42, p. 95–110, 2018.

TENORE, G. C.; CAMPIGLIA, P.; RITIENI, A.; NOVELLINO, E. *In vitro* bioaccessibility, bioavailability and plasma protein interaction of polyphenols from Annurca apple (*M. pumila* Miller cv Annurca). **Food Chemistry**, v. 141, p. 3519–3524, 2013.

TOALDO, I. M. Potencial bioativo de sucos de uva *vitis labrusca* L.: caracterização química e atividade antioxidante, influência de sementes de uva e de pectinases na composição fenólica, e bioatividade do *trans*-resveratrol em células humanas. 197 f. **Tese de doutorado** (Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

TOALDO, I. M.; FOGOLARI, O.; PIMENTEL, G. C.; GOIS, J. S.; BORGES, D. L. G.; CALIARI, V., BORDIGNON-LUIZ, M. T Effect of grape seeds on the polyphenol bioactive content and elemental composition by ICP-MS of grape juices from *Vitis labrusca* L. **LWT - Food Science and Technology**, v. 53, p. 1-8, 2013

TOALDO, I. M.; CRUZ, F. A.; ALVES, T. L.; GOIS, J. S.; BORGES, D. L. G.; CUNHA, H. P.; SILVA, E. L.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Bioactive potential of *Vitis labrusca* L. grape juices from the Southern Region of Brazil: Phenolic and elemental composition and effect on lipid peroxidation in healthy subjects. **Food Chemistry**, v. 173, p. 527–535, 2015.

TOALDO, I. M.; CAMP, J. V.; GONZALES, G.B.; KAMILOGLU, S.; BORDIGNON-LUIZ, M.T.; SMAGGHE, G.; RAES, K.; CAPANOGLU, E.; GROOTAERT, C. Resveratrol improves TNF- α -induced endothelial dysfunction in a coculture model of a Caco-2 with an endothelial cell line. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 36, p. 21–30, 2016.

TORRE, L. A. et al. Global cancer statistics, 2012. **CA: A cancer journal for clinicians**, v. 65, n. 2, p. 87-108, 2015.

TRAVAGLIA, F.; BORDIGA, M.; LOCATELLI, M.; COISSON, J. D.; ARLORIO, M. Polymeric proanthocyanidins in skins and seeds of 37 *Vitis vinifera* L. cultivars: a methodological comparative study. **Food Chemistry**, v. 76, p. 742– 749, 2011.

TRELA, B.C.; WATERHOUSE, A. L. Resveratrol: isomeric molar absorptivities and stability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 1253- 1257, 1996.

ULLAH, M. F.; BHAT, S. H.; HUSAIN, E.; ABU-DUHIER, F.; HADI, S.M.; SARKAR, F.H.; AHMAD, A. Cancer chemopreventive pharmacology of phytochemicals derived from plants of dietary and non-dietary origin: implication for alternative and complementary approaches. **Phytochemistry Reviews**, v. 13, p. 811-833, 2014.

VALLS, J.; MILLÁN, S.; MARTÍ, M.P.; BORRÀS, E.; AROLA, L. Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 43, p. 7143– 7172, 2009.

VALLEJO, F.; GIL-IZQUIERDO, A.; PÉREZ-VICENTE, A.; GARCÍA-VIGUERA, C. *In vitro* gastrointestinal digestion study of broccoli inflorescence phenolic compounds, glucosinolates, and vitamin C. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 52, p. 135–138, 2004.

VAUZOUR, D.; VAFEIADOU, K.; RENDEIRO, C.; CORONA, G.; SPENCER, J. P. E. The inhibitory effects of berry-derived flavonoids against neurodegenerative processes. **Journal of Berry Research**, v. 1, p. 45-52, 2010.

VENTURIN, L. Influência da temperatura de extração na elaboração de suco de uva Isabel (*Vitis labrusca*) pelo método de arraste de vapor. 2004. 31 f. **Monografia**- Centro Federal de Educação Tecnológica, Bento Gonçalves, 2004.

VERGARA-SALINAS, J. R.; VERGARA, M.; ALTAMIRANO, C.; GONZALEZ, A.; PÉREZ-CORREA, J. R. Characterization of pressurized hot water extracts of grape pomace: Chemical and biological antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 171, p. 62–69, 2015.

VERSANTVOORT, C. H.; OOMEN A. G. E. V.; ROMPELBERG, C. J.; SIPS A. J. Applicability of an *in vitro* digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 31-40, 2005.

VILANOVA, M.; MASA, A. Flavonoid and aromatic characterisation of cv. Albarín blanco (*Vitis vinifera* L.). **Food Chemistry**, v. 107, p. 273-281, 2008.

VU, K. D.; CARLETTINI, H.; BOUVET, J.; CÔTÉ, J.; DOYON, G.; SYLVAIN, J. F.; LACROIX, M. Effect of different cranberry extracts and juices during cranberry juice processing on the antiproliferative activity against two colon cancer cell lines. **Food Chemistry**, v. 132, p. 959–967, 2012.

YANG, Z.; YANG, S.; MISNER, B. J.; CHIU, R.; LIU, F.; MEYSKENS, F. L. Nitric oxide initiates progression of human melanoma via a feedback loop mediated by apurinic/apyrimidinic endonuclease-1/redox factor-1, which is inhibited by resveratrol. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 7, p. 3751–3760, 2008.

YU, J.; AHMEDNA, M. Functional components of grape pomace: Their composition, biological properties and potential applications. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 48, p. 221-237, 2013.

ZHANG, Y. J.; SEERAM, N. P.; LEE, R.; FENG, L.; HEBER, D. Isolation and identification of strawberry phenolics with antioxidant and human cancer cell anti proliferative properties. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 56, p. 670–675, 2008.

WANG, L.S.; STONER, G.D. Anthocyanins and their role in cancer prevention. **Cancer letters**, v. 269, p. 281-290, 2008.

WANG, H.; GUO, X.; HU, X.; LI, T.; FU, X.; LIU, R. H. Comparison of phytochemical profiles, antioxidant and cellular antioxidant activities

of different varieties of blueberry (*Vaccinium spp.*) **Food Chemistry**, v. 217, p. 773–781, 2017.

WOOD, R. J.; ZHENG, J. J. High dietary calcium intakes reduce zinc absorption and balance in humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 65, p. 1803-1809, 1997.

ZUBIK, L.; MEYDANI, M. Bioavailability of soybean isoflavones from aglycone and glucoside forms in American women. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 77, p. 1459–1465, 2003.

ZULUETA, A.; CARETTI, A.; SIGNORELLI, P.; GHIDONI, R. Resveratrol: A potential challenger against gastric cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, p. 10636–10643, 2015.