

UNIVERSIDADE VILA VELHA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E QUIMIOPREVENTIVA DE CÂNCER
DA UVA HÍBRIDA MÁXIMO (IAC 138-22) COLETADA EM
DIFERENTES ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO**

DÉBORA RIGAMONTI GOMES CRUZ FREIRE

VILA VELHA
ABRIL / 2018

UNIVERSIDADE VILA VELHA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E QUIMIOPREVENTIVA DE CÂNCER
DA UVA HÍBRIDA MÁXIMO (IAC 138-22) COLETADA EM
DIFERENTES ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, para a obtenção do grau de Mestra em Ciências Farmacêuticas.

DÉBORA RIGAMONTI GOMES CRUZ FREIRE

VILA VELHA

ABRIL / 2018

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

F862a Freire, Débora Rigamonti Gomes Cruz.

Atividades antioxidante e quimiopreventiva de câncer da uva híbrida Máximo (IAC 138-22) coletada em diferentes estádios de maturação / Débora Rigamonti Gomes Cruz Freire. – 2018.

40 f.: il.

Orientador: Rodrigo Scherer.
Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) -
Universidade Vila Velha, 2018.

Inclui bibliografias.

1. Farmacologia e terapêutica. 2. Câncer - Tratamento.
I. Scherer, Rodrigo. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 615

DÉBORA RIGAMONTI GOMES CRUZ FREIRE

**ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E QUIMIOPREVENTIVA DE CÂNCER
DA UVA HÍBRIDA MÁXIMO (IAC 138-22) COLETADA EM
DIFERENTES ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO**

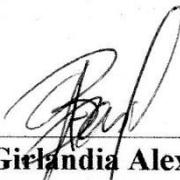
Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, para a obtenção do grau de Mestra em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 02 de abril de 2018,

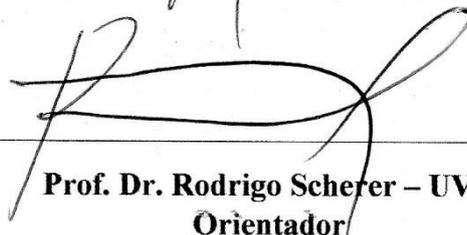
Banca Examinadora:



Prof. Dr. Stanislaw Bogusz Junior – USP



Profa. Dra. Gielandia Alexandre Brasil – UVV



**Prof. Dr. Rodrigo Schefer – UVV
Orientador**

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a Deus que fez com que mais um projeto se tornasse possível. “Porque d’Ele, por Ele e para Ele são todas as coisas, glória pois a Ele eternamente. Amém” (Romanos 11:36)

AGRADECIMENTOS

- ✓ A minha gratidão a Deus por tudo que Ele tem feito em minha vida. Sou eternamente grata por sua graça e amor derramados diariamente sobre mim e por me presentear com mais essa dádiva de conquistar esse título.
- ✓ A FAPES por ser instrumento de Deus para abençoar a minha vida com essa bolsa de estudos que tornou possível o meu ingresso à pós-graduação!
- ✓ Ao meu marido Hygoor Jorge, que desde que nos conhecemos foi sempre incentivador e motivador em todos os projetos que me propus a fazer. Muito obrigada pela sua paciência e cuidado em tudo! Amo-te para sempre!
- ✓ Sou muito grata aos meus pais Paulo César e Alcinéia por sempre me incentivarem a estudar, por não terem medido esforços para que eu pudesse chegar até aqui. Amo vocês!
- ✓ Aos meus irmãos Douglas e Bruno, juntamente com minhas cunhadas Raynara e Yasmin e meus sobrinhos Lara e Theo. Sem vocês a vida não teria graça! Amo vocês demais da conta!
- ✓ A todos da minha família, meus avós queridos Ana e Almerindo, meus tios Aurinéia e Edmar, Carlos Augusto e Deila! Que todos se sintam abraçados e representados pelos nomes citados aqui. Amo todos vocês e sei que oraram para que eu pudesse finalizar mais essa etapa!
- ✓ À minha sogra Silvana e meu sogro Jorge Leopoldo pelo apoio e torcida de sempre! Às minhas cunhadas Luana e Jôvana, meus cunhados André e Luiz Paulo, meus sobrinhos Lucas e Laura por sempre se fazerem presentes. Amo vocês!
- ✓ Ao meu querido orientador Prof. Dr. Rodrigo Scherer por acreditar em mim e me adotar nesses dois anos que se passaram... agradeço de coração o incentivo, as ideias, a doação, o empréstimo de todo seu conhecimento e os churrascos incríveis! Muito obrigada mesmo!
- ✓ À família do laboratório 30 (UVV) que tornou cada dia mais leve e divertido e fez tudo valer a pena! Mayara, Leandra, Felipe, Nathacha, Karla, Camile, Caroline, Patrícia e Fernandinho! Muito obrigada a todos pelo carinho, apoio, incentivo e ajuda de sempre! Vocês são muito especiais e estarão para sempre no meu coração!
- ✓ Ao Prof. Dr. Stanislaw Bogusz Júnior por ter aberto as portas do seu laboratório na USP de São Carlos, pela receptividade, zelo e cuidado que teve comigo, me proporcionando aprender novas técnicas e conhecer uma galera muito especial. A todos do laboratório da cachaça (lab 50) que me receberam como se me conhecessem há muito tempo e que

foram muito importantes para meu aprendizado durante o tempo em que estive por lá: Stephano, Larissa, Renato, Lucas e Pamela. Vocês sempre serão lembrados por mim!

- ✓ A todos do laboratório de cultura de células, na pessoa do prof. Dr. Márcio, pelo apoio constante e principalmente por me ensinarem não apenas com as técnicas, mas com carinho e com o coração: Mariana, Maria Carolina, Hugo, Thais, Mariane e Lorena.
- ✓ À Flávia, que sempre esteve disponível não só para auxiliar com os experimentos, mas por ir além e sempre se preocupar com as explicações de tudo, para que eu entendesse tudo que estava fazendo;
- ✓ A profa. Dra. Denise pela parceria e apoio de sempre;
- ✓ Ao prof. Dr. Levi pela parceria e empréstimo de equipamentos;
- ✓ A Ana Cláudia e todos do laboratório de Ciências Químicas por sempre me socorrerem quando precisei;
- ✓ A todos do laboratório 31 pela colaboração e disponibilidade de sempre;
- ✓ Aos meus amigos que são praticamente da família: Stéphanie, Ellencristina, Thiago, Letícia, Lara, Emanuel;
- ✓ O meu agradecimento ao prof. Dr. Thiago que foi o responsável por me incentivar a fazer a prova e a cursar a pós-graduação;
- ✓ Agradeço também aos professores queridos que tive aqui. Cito o prof. Dr. Vasquez, a profa. Dra. Mariceli e o prof. Dr. Márcio, com quem tive mais proximidade e gostaria que todos os professores se sentissem agradecidos através da pessoa desses mestres queridos.

Todos vocês fazem parte de cada pedacinho dessa conquista indescritível!

SUMÁRIO

RESUMO	12
ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO	15
2. MATERIAL E MÉTODOS	18
2.1. Materiais.....	18
2.2. Reagentes.....	18
2.3. Preparação dos extratos.....	19
2.4. Determinação das substâncias fenólicas totais.....	20
2.5. Quantificação de taninos em microplacas.....	20
2.6. Conteúdo total de antocianinas.....	21
2.7. Avaliação da atividade antioxidante.....	21
2.7.1 Método DPPH.....	21
2.7.2. Método FRAP.....	22
2.7.3. Método ABTS.....	22
2.7.4. Método pelo sequestro do peróxido de hidrogênio.....	23
2.8. Avaliação da viabilidade celular – MTT.....	23
2.9. Atividade quimiopreventiva de câncer.....	24
2.9.1. Ensaio <i>in vitro</i> de indução da quinona redutase.....	24
2.9.2 Ensaio de atividade inibitória de NFκ-B induzido por TNF-α.....	24
2.9.3 Ensaio de atividade inibitória da aromatase.....	25
2.10. Análise estatística.....	25
3. RESULTADOS	25
3.1. Rendimento, fenólicos totais, conteúdo total de antocianinas e taninos.....	25
3.2. Atividade antioxidante.....	27
3.3. Viabilidade celular.....	30
3.4. Quimioprevenção de câncer.....	30
4. DISCUSSÃO	32
5. CONCLUSÃO	34
6. REFERÊNCIAS	35

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Cinco diferentes estádios durante a maturação das uvas em uma vinícola de Santa Teresa – ES. Data das coletas: 1 – 10/12/2016; 2 – 19/12/2016; 3 – 23/12/2016; 4 – 28/12/2016 e 5- 05/01/2017..... 19

Figura 2 - Efeitos dos extratos de semente, casca e polpa da uva híbrida Máximo (IAC 138-22), e resveratrol na concentração de 100 µg/mL sobre a viabilidade de células de macrófagos RAW 264,7 e células de câncer de pele MV3 após 24 h de exposição avaliado pelo ensaio colorimétrico do MTT..... 31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Determinação do rendimento, total de fenólicos, teor de antocianinas e taninos.....	26
Tabela 2 - Atividade antioxidante dos extratos da uva híbrida Máximo (IAC 138-22) pelos métodos DPPH, FRAP, ABTS e H ₂ O ₂	28
Tabela 3 – Matriz de correlação para as amostras de sementes de uvas.....	29
Tabela 4 – Matriz de correlação para as amostras de cascas de uvas.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS – Ácido sulfônico 2,2-Azino-bis 3- etilbenzotiazolina-6

ANOVA – Análise de variância

DCVs – Doenças Cardiovasculares

DMSO – Dimetilsulfóxido

DPPH – Ensaio 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

ELISA – Elisa Spectra count Packad

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias

EROs – Espécies reativas de oxigênio

FRAP – Poder antioxidante de redução férrica

IAA – Índice de atividade antioxidante

IAC – Instituto Agronômico de Campinas

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

NFκ-B – Fator de transcrição κ-B

PBS – Solução tampão

QR – Quinona redutase

TNF-α – Fator de necrose tumoral

TPTZ – 2,4,6-tri (2-piridil)-1,3,5-triazina

UV – Ultravioleta

RESUMO

FREIRE, DÉBORA RIGAMONTI GOMES CRUZ, M.Sc, Universidade Vila Velha – ES, abril de 2018. **Atividades antioxidante e quimiopreventiva de câncer da uva híbrida Máximo (IAC 138-22) coletada em diferentes estádios de maturação.** Orientador: Dr. Rodrigo Scherer.

As uvas são ricas em substâncias fenólicas que podem apresentar diversas atividades bioativas. O objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade antioxidante e quimiopreventiva de câncer da uva híbrida Máximo (IAC 138-22). As uvas foram coletadas em diferentes estádios de maturação em uma vinícola de Santa Teresa - ES. Nos extratos etanólicos foram determinados o teor de substâncias fenólicas totais, antocianinas e taninos. A atividade antioxidante das amostras foi avaliada pelos métodos DPPH, FRAP, ABTS e sequestro do peróxido de hidrogênio. A viabilidade celular foi verificada pelo MTT e a atividade quimiopreventiva de câncer foi testada pela indução da quinona redutase, pela atividade inibitória de NFκ-B induzido por TNF-α, e através da atividade inibitória da enzima aromatase. O presente estudo revelou uma concentração de fenólicos significativamente maior nas sementes do que nas cascas. O teor de fenólicos reduziu significativamente com o avanço da maturação das uvas. Antocianinas foram detectadas apenas nas cascas, e os valores foram significativamente maiores nos frutos mais maduros (83,9 mg/g extrato) e menores nas cascas totalmente verdes (2,9 mg/g extrato). Analisando os métodos DPPH, ABTS e FRAP, observou-se que todas as sementes apresentaram elevada atividade antioxidante, enquanto as cascas totalmente verdes demonstraram moderada atividade. Já o resveratrol, pelo método DPPH, apresentou forte atividade (IAA = 1,5), sendo portanto, inferior às sementes estudadas (IAA = 4,7 a 3,3). A porcentagem de inibição (I%) do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foi maior na semente verde, enquanto não houve diferença significativa entre as cascas, independentemente do grau de maturação. As amostras de sementes, cascas e polpas foram testadas pelo método MTT na concentração de 100 µg/mL e não apresentaram citotoxicidade para a linhagem de macrófagos e melanoma (MV3). As atividades quimiopreventivas de câncer dos testes estudados não apresentaram os resultados esperados, em contrapartida, os resultados indicaram um potente efeito antioxidante, principalmente das sementes. Tornam-se necessárias novas pesquisas para caracterização dos fenólicos, bem como o isolamento das amostras em potencial, tais como a semente 3, que apresentou 68% de inibição da aromatase.

Palavras chaves: peróxido de hidrogênio; citotoxicidade; resveratrol; semente de uva; fenólicos.

ABSTRACT

FREIRE, DÉBORA, M.Sc, University of Vila Velha – ES, april 2018. **Antioxidant and chemopreventive activities of cancer of the maximum hybrid grape (IAC 138-22) collected at different maturation stages.** Advisor: Dr. Rodrigo Scherer.

The grapes are rich in phenolic substances that can present several bioactive activities. The objective of this study was to evaluate the antioxidant and chemopreventive activity of cancer of the Maximum hybrid grapes (IAC 138-22). The grapes were collected at different maturation stages in a winery in Santa Teresa - ES. In the ethanolic extracts the total phenolic substances anthocyanins and tannins were determined. The antioxidant activity of the samples was evaluated by the DPPH, FRAP, ABTS and scavenging of hydrogen peroxide methods. Cell viability was verified by MTT and the chemopreventive activity of cancer was tested by the induction of quinone reductase, TNF- α -induced NF κ -B inhibition assay, and by the inhibitory activity of the aromatase enzyme. The present study revealed a significantly higher phenolic concentration in the seeds than in the skin. The phenolic content significantly reduced with the advancement of grape maturation. Anthocyanins were detected only in the skins, and the values were significantly higher in the more mature fruits (83.9 mg / g extract) and lower in the totally green skins (2.9 mg / g extract). Analyzing the DPPH, ABTS and FRAP methods, it was observed that all the seeds showed high antioxidant activity, while the totally green skins showed moderate activity. Resveratrol, by DPPH method, showed strong activity (IAA = 1.5), being therefore lower than the studied seeds (IAA = 4.7 to 3.3). The percentage of inhibition (I%) of hydrogen peroxide (H₂O₂) was higher in the green seed, while there was no significant difference between the skins, regardless of the degree of maturation. Seed, skin and pulp samples were tested by the MTT method at a concentration of 100 μ g/mL and showed no cytotoxicity to the macrophages and melanoma (MV3) lineage. The chemopreventive activities of cancer of the tests studied did not present the expected results, in contrast the results indicated a potent antioxidant effect, mainly of the seeds. Further research is required to characterize the phenolics, as well as the isolation of potential samples, such as seed 3, which presented 68% inhibition of aromatase.

Keywords: hydrogen peroxide; cytotoxicity; resveratrol; grape seed; phenolics.

Atividades antioxidante e quimiopreventiva de câncer da uva híbrida Máximo (IAC 138-22) em diferentes estádios de maturação

Débora Rigamonti Gomes Cruz Freire¹, Stanislau Bogusz Junior², Rodrigo Scherer^{1*}

¹ Natural Products Laboratory, Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, University of Vila Velha, Espírito Santo, Brazil.

² Institute of Chemistry of São Carlos, Graduate Program in Chemistry, University of São Paulo, São Carlos, São Paulo, Brazil.

*Corresponding author:

Rodrigo Scherer, Ph.D.

Department of Pharmacy, University of Vila Velha / UVV-ES. Comissário José Dantas de

Melo St., 21, Boa Vista, Vila Velha, Espírito Santo, Brazil, 29102-770.

Telephone number: 55-27-3421-2198; Fax number: 55-27-3421-2049

Email address: rodrigo.scherer@uvv.br

1. INTRODUÇÃO

As uvas são frutas muito apreciadas ao redor do mundo, e a sua utilização é bem diversificada. Elas podem ser consumidas *in natura*, bem como na forma de vinhos, sucos, geleias, suplementos alimentares, na fabricação de sorvetes ou desidratada, entre outras formas industrializadas. Pode-se dizer que as uvas são alimentos consumidos há milênios, e alvo de muitos estudos em todo o mundo devido às suas propriedades nutricionais [1]. São constituídas por variados nutrientes, tais como carboidratos, proteínas, vitaminas, minerais e fibras alimentares, além de fitoquímicos, como as substâncias fenólicas reconhecidos por apresentarem diversas atividades biológicas, como ação antiinflamatória, antimicrobiana, antitumoral, com destaque para a ação antioxidante [2].

As substâncias fenólicas presentes nas uvas podem ser classificadas em flavonoides e não-flavonoides. Do primeiro grupo fazem parte os flavanois (catequina, epicatequina e epigallocatequina), flavonois (caempferol, quercetina e miricetina) e antocianinas (cianidina e malvidina), e ao segundo grupo pertencem os ácidos fenólicos, hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos, bem como uma ampla variedade de taninos [3] e terpenos [4]. Além desses compostos, pode-se encontrar o resveratrol, pertencente à classe dos estilbenos [3].

Os flavonoides são amplamente distribuídos nas uvas e podem ser encontrados na semente, polpa, casca, folha e caule, contendo especialmente catequinas, quercetina e antocianinas [5]. As catequinas e epicatequinas presentes, principalmente em sementes de uva, são os principais componentes responsáveis pela adstringência de vinhos e sucos de uva [6]. Já a quercetina, caempferol e miricetina atuam como co-pigmentos e juntamente com as antocianinas, possuem um importante papel no desenvolvimento da coloração do vinho [2]. As antocianinas são pigmentos naturais, responsáveis pela coloração laranja, vermelha, azul e violeta de algumas flores e frutos. Em uvas vermelhas, os principais polifenóis são as antocianinas presentes principalmente na casca das uvas e responsáveis pela cor dos frutos [7]. As principais antocianinas encontradas são provenientes da cianidina, peonidina, delphinidina,

petunidina e malvidina que ocorrem, geralmente, na forma de glicosídeos e acilglicosídeos, sendo a malvidina-3-glicosídeo o mais abundante em quase todas as variedades de uvas [7]. Representam um constituinte importante para a produção de vinhos, uma vez que contribuem para os atributos sensoriais e, principalmente, para a coloração do vinho [8].

Os ácidos fenólicos, apesar de serem encontrados em baixas concentrações, contribuem como um dos principais compostos nas uvas brancas, sendo capazes de influenciar o gosto, o sabor e aroma dos vinhos. Além das características organolépticas, deve-se ressaltar que todos esses compostos contribuem para aumentar as propriedades benéficas dessas bebidas, sejam vinhos ou sucos, além de serem compostos simples, como ácido gálico, ou de estruturas mais complexas, como os taninos [9].

Conhecer os metabólicos secundários supramencionados é de suma importância, pois a eles são atribuídas atividades biológicas relevantes, destacando-se a quimioprevenção de câncer [10]. O uso de agentes naturais, biológicos ou sintéticos, capazes de suprimir, reverter ou prevenir as fases iniciais da carcinogênese é conhecido como quimioprevenção. Esses agentes também podem ser capazes de impedir a progressão de células pré-malignas [11]. De acordo com Kelloff et al. [12], a quimioprevenção primária está relacionada à administração de agentes em uma população com fatores de risco particulares, mas em bom estado de saúde e que não apresentem manifestação de doenças; já a quimioprevenção secundária consiste na administração de agentes que possam prevenir a progressão do câncer, identificando os indivíduos com lesões pré-malignas [12]. Os compostos carcinogênicos são impedidos de reagirem em alvos teciduais pelo que pode ser denominado de “agentes bloqueadores” (*blocking agents*) na quimioprevenção secundária [13]. Sabe-se que o câncer é um processo crônico determinado pelo crescimento descontrolado de células anormais e sua incidência global vem aumentando consideravelmente, o que desperta o interesse de conhecer novas estratégias de prevenção dessa doença [14].

Muitos são os estudos relacionados com as diferentes espécies de uvas envolvidas em processos benéficos à saúde, tais como a quimioprevenção do câncer. Sabe-se que existem três principais tipos de uvas, em que se destacam as uvas europeias (*Vitis vinifera*), os híbridos franceses e as uvas da América do Norte (*Vitis labrusca e Vitis rotundifolia*) [15]. Ao considerar o cenário mundial, as uvas europeias *Vitis vinifera* são as mais produzidas. No Brasil, porém, essa realidade é diferente e a importância econômica na viticultura não está atrelada a essa espécie de uvas [16]. De acordo com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) [17], observa-se uma predominância de uvas híbridas ou americanas em várias regiões produtoras. Embora esse seja o cenário, algumas regiões brasileiras, mesmo que a produção seja em um percentual menor, optam por um cultivo exclusivo de *Vitis vinifera* [17].

Esse fator pode ser explicado devido às condições climáticas desfavoráveis para produção de *Vitis vinifera* em várias regiões do Brasil, uma vez que a maturação e a colheita das uvas são dependentes de períodos de chuva. Outro fator a ser considerado é que as uvas americanas tendem a ser mais resistentes às doenças, o que caracteriza uma vantagem, além de se adaptarem bem às condições climáticas adversas, tais como verões úmidos, comuns no Brasil [16].

A Embrapa e o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), a partir do melhoramento genético passaram a produzir as uvas híbridas Máximo (IAC 138-22), que são resultantes do cruzamento entre as uvas Syrah (*Vitis vinifera*) e Seibel 11342 (híbrida), a fim de melhorar a capacidade de resistência aos patógenos e adequar a qualidade sensorial dos subprodutos dessas uvas híbridas. De acordo com Biasoto et al. [16], estes híbridos são promissores para a produção de vinhos de qualidade em regiões brasileiras.

A literatura atual deixa claro que as uvas híbridas Máximo (IAC 138-22) são de cultivo recente e pouco se conhece sobre sua composição e propriedades biológicas, tampouco a influência da maturação sobre as mesmas. Dessa forma, considerando a importância econômica do desenvolvimento de novas uvas híbridas e sabendo que ainda existem poucos trabalhos a

respeito da composição e propriedades biológicas dessas uvas, principalmente da variedade híbrida Máximo (IAC 138-22), o presente trabalho teve como objetivo avaliar as atividades antioxidante e quimiopreventiva de câncer da uva híbrida Máximo (IAC 138-22), coletadas em diferentes estádios de maturação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Reagentes

Carbonato de sódio anidro, ácido gálico, 2,2 difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), 2,4,6-tri (2-piridil)-1,3,5-triazina (TPTZ), ácido 2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS), persulfato de potássio, peroxidase e resveratrol foram obtidos da Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA. Ácido clorídrico, ácido acético, fosfato de potássio monobásico e dibásico e cloreto de potássio foram obtidos da Cromoline®, Diadema, SP. O reagente folin-ciocalteu foi obtido da Merck®, Darmstadt, Alemanha, e o etanol 99,5% foi obtido da Quimex®, Cotia, SP. Acetato de sódio e cloreto férrico foram obtidos da Dinâmica®, Diadema, SP. Peróxido de hidrogênio e hidróxido de sódio foram adquiridos da Neon®, São Paulo, SP. O vermelho de fenol foi obtido da Synth®, Diadema, SP.

2.2. Amostras

As uvas híbridas Máximo (IAC 138-22) foram cultivadas em um sistema de espaldeiras, coletadas em uma vinícola do município de Santa Teresa, Espírito Santo (19°55'03.7"S 40°44'00.1"W) em cinco estádios diferentes de maturação, sendo realizada uma coleta por semana a partir do início da maturação, nos dias 10 (4,2 kg), 19 (3,2 kg), 23 (3,6 kg), e 28/12/2016 (3,6 kg), e 05/01/2017 (3,6 kg). A data da primeira coleta correspondeu ao estádio mais verde dos frutos [Semente 1 (S1), Casca 1 (C1), Polpa 1 (P1)], e a última data de coleta correspondeu ao estádio mais maduro do fruto [Semente 5 (S5), Casca 5 (C5), Polpa 5 (P5)]. A

Figura 1 mostra as principais diferenças entre o grau de maturação das uvas e corresponde exatamente aos dias em que as amostras foram colhidas.



Figura 1 – Cinco diferentes estádios durante a maturação das uvas em uma vinícola de Santa Teresa – ES. Data das coletas: 1 – 10/12/2016; 2 – 19/12/2016; 3 – 23/12/2016; 4 – 28/12/2016 e 5 – 05/01/2017.

A coleta foi realizada em ambos os lados das fileiras selecionadas, evitando-se as duas primeiras vinhas de cada fileira. As uvas foram lavadas em água corrente, e posteriormente, lavadas em água deionizada por três vezes; em seguida foram separadas em cascas, polpas e sementes cuidadosamente de forma manual. Cada fração foi congelada a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ em ultra freezer (CL580-86V, Coldlab®), liofilizadas (Liofilizador Enterprise I - Terroni®), trituradas em moinho de facas e armazenadas em geladeira ($8\text{ }^{\circ}\text{C}$) em frascos âmbar até o momento das análises.

2.3. Preparação dos extratos

A extração foi realizada utilizando 20 g de material liofilizado para 200 mL de etanol 99,5% pelo método de maceração assistida por ultrassom (Elmasonic P 60 Hz – Elma®), conforme protocolo descrito por Guss et al. [18] modificado. Após 2 ciclos de 30 minutos, os extratos foram filtrados em papel filtro. Esse processo foi repetido mais uma vez. As frações

orgânicas foram reunidas e evaporadas em aparelho de evaporação rotatório (Fisatom® 802 – 1200W) até a remoção do etanol, com finalização do processo na estufa (TE 394/2 MP, 1500W – Tecnal®) por 24 h a 40 °C e, posteriormente, liofilizadas por 24 h.

2.4. Determinação das substâncias fenólicas totais

O conteúdo total de substâncias fenólicas foi determinado pelo método Folin-Ciocalteu, segundo a metodologia descrita por Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventos [19] modificado por Guss et al. [18]. Foram utilizados 30 µL dos extratos na concentração de 0,5 mg/mL em etanol e 150 µL do reagente de Folin diluído em água (1/10). Após 5 minutos, foi adicionado 120 µL de carbonato de sódio anidro a 7 %, que reagiu por 90 minutos no escuro. A leitura foi realizada em leitor de ELISA (Elisa Spectra count Packad – EUA) a 740 nm. Os resultados foram expressos em miligramas de ácido gálico por grama de extrato.

2.5. Quantificação de taninos em microplacas

Para analisar os componentes químicos foram pesados 60 mg dos extratos de casca, polpa e semente, que após total solubilização foram transferidos para um balão de fundo chato contendo 150 mL de água isenta de gás carbônico, conforme metodologia descrita por Krepsky et al. [20] com adaptações. Em seguida o balão foi mantido em banho-maria por 30 minutos a 60°C. A solução foi filtrada e transferida para um balão volumétrico de 250 mL, completando-se o volume com água isenta de gás carbônico, desprezando os primeiros 50 mL, sendo denominada solução A. Retirou-se 20 mL da solução A e adicionou-se 0,2 g de Polivinilpirrolidona (PVPP) em um erlenmeyer, que foi agitado por 60 minutos. Após agitação, a solução foi filtrada e denominada solução B. Em uma microplaca de 96 poços, foram transferidos 25 µL da solução A ou B juntamente com 10 µL do reagente folin-ciocalteu (10 %) e 215 µL de carbonato de sódio (10,6 % p/v). A leitura foi realizada em 715 nm após 3 minutos, utilizando a água como branco. Como padrão, utilizou-se o ácido gálico. O teor de

taninos foi determinado pela subtração do teor de polifenóis totais (solução A) pelo teor de polifenóis não adsorvidos (solução B).

2.6. Conteúdo total de antocianinas

O total de antocianinas foi determinado usando o método de pH diferencial (Phmetro Spence® SP3611), conforme descrito por Giusti e Wrolstad [21]. A absorbância dos extratos preparados foi monitorada de acordo com a equação 1: $A = (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}}) \text{pH}_{1.0} - (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}}) \text{pH}_{4.5}$. As amostras foram testadas na concentração de 5 mg/mL e dissolvidas com tampão de cloreto de potássio 0,025 M e em seguida, tampão acetato de sódio 0,4 M. A concentração (mg/L) de antocianinas foi expressa em cianidina-3-glucosídeo e calculada usando a equação 2: $(A \times \text{MW} \times \text{DF} \times 1000) / (\epsilon \times L)$; no qual A é obtido na equação 1, MW é o peso molecular para cianidina-3-glucosídeo, DF é o fator de diluição, ϵ é absorvidade molar (26,900), e L é o caminho ótico (1 cm). As leituras foram realizadas em um espectrofotômetro (T80 + PG Instrumentos Ltda®), nas absorbâncias de 520 e 700 nm. Os resultados foram expressos em mg de antocianinas/ g de extrato.

2.7 Avaliação da atividade antioxidante

2.7.1. Método DPPH (2,2 – difenil-1-picrilhidrazil)

A atividade antioxidante, pelo método de DPPH, foi realizada segundo a metodologia de Scherer e Godoy [22] modificado. Foram utilizados 20 μL do extrato nas concentrações de 500 $\mu\text{g/mL}$ (sementes), 2000 $\mu\text{g/mL}$ (cascas), 10000 $\mu\text{g/mL}$ (polpas) e 280 μL de DPPH (40 $\mu\text{g/mL}$), ambos em etanol. Para o branco, foram utilizados 20 μL de etanol e 280 μL de DPPH. Reagiu-se por 60 minutos no escuro e a leitura foi realizada em leitor de ELISA a 517 nm. O índice DPPH foi calculado através da equação 2: $I (\%) = [(Abs_B - Abs_T)/Abs_B] \times 100$, em que, Abs_B é a absorbância média do branco e Abs_T é a absorbância do teste. O IR_{50} foi calculado pela equação da reta obtida da curva de calibração (concentração *versus* o índice DPPH

correspondente). A ação antioxidante dos extratos foi expressa pelo índice de atividade antioxidante (IAA), que é calculado através da equação 3: $IAA = DPPH \text{ final } (\mu\text{g/mL}) / IR_{50} (\mu\text{g/mL})$. De acordo com Scherer e Godoy [22], valores de IAA acima de 2,0 indicam atividade antioxidante muito forte, valores entre 1,0 e 2,0 indicam uma atividade forte, valores entre 0,5 e 1,0 indicam atividade moderada, entre 0,5 e 0,1 correspondem a uma fraca atividade antioxidante e abaixo de 0,5 indicam baixa atividade antioxidante. A atividade das amostras foi comparada com a atividade do resveratrol (200 $\mu\text{g/mL}$).

2.7.2. Método FRAP (Poder antioxidante de redução férrica)

A atividade antioxidante pelo método de redução do íon férrico (FRAP) foi realizada segundo a metodologia de Benzie e Strain [23] modificada. Utilizou-se 30 μL do extrato nas concentrações de 300 $\mu\text{g/mL}$ (sementes) e 3000 $\mu\text{g/mL}$ (cascas e polpas) em etanol e 270 μL do reagente FRAP. Esse reagente foi preparado na proporção de 10:1:1 a partir da solução de acetato de sódio triidratado a 0,3 M, solução de TPTZ em solução de HCl 10 mM e uma solução de cloreto férrico 20 mM. Para o branco, utilizou-se 30 μL de etanol e 270 μL de FRAP. Reagiu-se por 10 minutos e a leitura foi realizada em leitor de ELISA a 593 nm. O índice de redução percentual (IR%) foi calculado pela equação 4: $I (\%) = [(Abs_T - Abs_B) \times 100]$, em que, Abs_T é a absorbância média dos testes e Abs_B é a absorbância do branco. Os resultados foram expressos em IR_{50} que foi calculado através de curva de calibração. A atividade das amostras foi comparada com a atividade do resveratrol (200 $\mu\text{g/mL}$).

2.7.3. Método ABTS (Ácido sulfônico 2,2- Azino-bis 3-etilbenzotiazolina-6)

A atividade antioxidante pelo método ABTS foi realizada segundo a metodologia de Re et al. [24] modificada. Foram preparados 7 mM de ABTS e 2,45 mM de persulfato de potássio diluídos em água, deixando reagir por 12-16 h no escuro para formação do radical $ABTS^{\bullet}$. Foram utilizados 30 μL do extrato na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$ (sementes) e 2000 $\mu\text{g/mL}$

(cascas e polpas) em etanol e 270 μL do reagente de ABTS*. Reagiu-se por 1 minuto e a leitura foi realizada em leitor de ELISA a 734 nm. O índice de redução percentual (IR%) foi calculado pela equação 5: $I (\%) = [(Abs_B - Abs_T)/(Abs_B) \times 100]$, em que, Abs_B é a absorbância média do branco e Abs_T é a absorbância do teste. Os resultados foram expressos em IR_{50} que foi calculado através de curva de calibração. A atividade das amostras foi comparada com a atividade do resveratrol (200 $\mu\text{g/mL}$).

2.7.4. Método pelo sequestro do peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

A atividade antioxidante pelo sequestro do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi realizada segundo a metodologia de Pick e Keisari [25] modificada. A mistura da reação teve volume final de 250 μL e continha: 25 μL da amostra teste com a concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ diluídas em série; 50 μL de H_2O_2 na concentração inicial de 10 mM, 20 μL de vermelho de fenol 0,1 mg/mL e 130 μL de tampão fosfato (PBS). Por último foi adicionado 25 μL da enzima peroxidase 8,5 U/mL. Essa mistura foi incubada à temperatura ambiente por 15 minutos e a reação foi terminada pela adição de NaOH 1M. A leitura foi realizada em leitor de ELISA a 610 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição do H_2O_2 através da equação: $I (\%) = [(Abs_C - Abs_T)/Abs_C] \times 100$, em que Abs_C é a absorbância do controle e Abs_T é a absorbância da amostra. O controle da reação foi realizado na ausência da peroxidase. Todo o experimento foi conduzido em triplicata e as soluções preparadas em tampão fosfato pH 7,0. A atividade das amostras foi comparada com a atividade do resveratrol.

2.8. Avaliação da viabilidade celular – Método MTT

Para investigar a atividade citotóxica foi utilizado o método colorimétrico do MTT de acordo com metodologia descrita por Mosmann [26]. Este método baseia-se na redução metabólica do brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (MTT) no interior da mitocôndria celular pela enzima succinato desidrogenase, formando um composto de coloração azul chamado formazana, que ao se acumular dentro da célula é removido por DMSO. O

método permite determinar a funcionalidade mitocondrial das células não tratadas e vem sendo amplamente utilizado para medir a sobrevivência e a funcionalidade celular de forma que a quantidade de células vivas é proporcional à quantidade de formazana produzida. Neste estudo foram empregadas culturas de macrófagos RAW 264,7 e câncer de pele - melanoma (MV3). As células foram plaqueadas na concentração de 7×10^4 células/mL em placas de 96 poços e cultivadas por 24 h com os extratos de sementes, cascas e polpas da uva híbrida Máximo na concentração de 100 µg/mL. As amostras foram diluídas em DMSO até a concentração final máxima de 0,5%. O resveratrol foi utilizado como controle positivo. Após o período de incubação de 24 h, 100 µL de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (5 mg/mL) foi adicionado em cada poço e os cristais de formazana formados foram dissolvidos com dimetilsulfóxido (DMSO). A leitura da absorbância das placas foi feita em leitor de ELISA, utilizando-se filtros de 595 nm. A viabilidade celular foi expressa em porcentagem.

2.9. Atividade quimiopreventiva de câncer

2.9.1. Ensaio *in vitro* de indução da quinona redutase

O ensaio de indução da quinona redutase foi realizado segundo método descrito por Prochaska e Santamaria [27] modificado e por Gerhauser et al. [28]. Para a avaliação dos extratos como indutores da enzima quinona redutase foi empregada cultura de hepatoma de rato, Hepa1c1c7, sendo testada a concentração de 20 µg/mL dos extratos de semente, casca e polpa de uva. Os resultados foram expressos em % de inibição (IR%).

2.9.2. Ensaio de atividade inibitória de NF-κB induzido por TNF - α

O ensaio com os extratos na concentração de 20 µg/mL foi realizado segundo descrito por Homhual et al. [29]. Para o ensaio de inibição de NF-κB foi empregada a linhagem celular 293-NF-κB (células embrionárias renais 293.12 PTA – 5554, transfectadas com NF-κB-luciferase), as quais foram cultivadas e induzidas por TNF - α (5 ng/mL) e o sistema repórter

usado foi Luc assay Promega®. Na-tosil-L-fenilalanina-clorometilcetona foi usado como controle positivo; $IC_{50} = 3,8$ nM. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os resultados foram expressos em % de inibição.

2.9.3. Ensaio de atividade inibitória da aromatase

O ensaio de inibição da aromatase foi realizado segundo descrito por Pezzuto et al. [30]. O efeito dos extratos (20 µg/mL) sobre a enzima aromatase foi avaliado pela detecção de fluoresceína, produto de hidrólise da dibenzilfluoresceína pela aromatase. A fluorescência foi medida a 485 nm (excitação) e 530 nm (emissão). Uma curva de naringenina foi usada como controle positivo (74,46 µM, a 0,57 µM). Os resultados foram expressos em % de inibição.

2.10. Análise estatística

Análise de variância (ANOVA) de 2 vias e teste post-hoc de Tukey foram utilizados para determinar se houve diferença significativa entre as médias e o quanto diferente elas são, respectivamente ($p < 0,05$). Os dados são paramétricos e expressos como média \pm desvio padrão. O coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado para medir o grau de correlação entre duas variáveis métricas. Utilizou-se o software Biostat 5.0.

3. RESULTADOS

3.1. Rendimento, fenólicos totais, conteúdo total de antocianinas e taninos

A Tabela 1 mostra o rendimento total dos extratos, assim como o conteúdo total de fenólicos, antocianinas e taninos. O rendimento foi maior na casca 1 (25,5%) e menor na polpa 3 (11,9%).

Tabela 1. Determinação do rendimento, total de fenólicos, teor de antocianinas e taninos.

	Rendimento (%)	CTF* (mg AG/g de extrato)	Antocianinas (mg/g de extrato)	Taninos (mg AG/100g de extrato)
Semente 1	19,5	217,2 ± 1,9 a	ND	26,1 ± 0,22 a
Semente 2	20,1	187,0 ± 7,0 b	ND	21,0 ± 1,4 b
Semente 3	16,7	153,1 ± 2,2 c	ND	16,0 ± 0,44 c
Semente 4	15,8	143,7 ± 1,9 d	ND	15,2 ± 0,3 c
Semente 5	12,3	132,5 ± 0,5 e	ND	14,3 ± 0,1 c
Casca 1	25,5	51,0 ± 3,7 f	ND	1,6 ± 0,4 d
Casca 2	23,3	27,9 ± 1,3 g	2,9 ± 0,5 d	1,2 ± 0,4 d
Casca 3	24,3	16,7 ± 0,4 h	63,1 ± 1,2 c	1,8 ± 0,2 d
Casca 4	24,4	19,8 ± 2,0 h	81,9 ± 0,2 b	2,4 ± 0,4 e
Casca 5	23,2	18,9 ± 1,6 h	83,9 ± 0,5 a	2,3 ± 0,4 e
Polpa 1	22,6	0,4 ± 0,1 i	ND	ND
Polpa 2	17,2	1,1 ± 0,3 i	ND	ND
Polpa 3	11,9	1,2 ± 0,3 i	ND	ND
Polpa 4	18,8	1,7 ± 0,0 i	ND	ND
Polpa 5	20,8	1,6 ± 0,1 i	ND	ND

*CTF: Conteúdo total de fenólicos. ND: não detectado. Diferentes letras na mesma coluna representam diferenças significativas ($p < 0,05$). AG: ácido gálico.

Verificou-se que o teor de fenólicos totais foi significativamente maior ($p < 0,05$) nas sementes do que na casca e polpa, além disso, foram verificados maiores teores nos estádios de maturação mais verde. Todas as sementes apresentaram diferença significativa quando comparadas entre si ($p < 0,05$), sendo a maturação inversamente proporcional ao conteúdo total de fenólicos, ou seja, quanto mais maduras as uvas, menor o teor de substâncias fenólicas. Apenas a casca 1 e 2 apresentaram diferença significativa ao serem contrapostas às cascas 3, 4 e 5 ($p < 0,05$). Não foi verificada diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) nas polpas avaliadas quanto ao teor de fenólicos.

O teor de antocianinas foi avaliado nas sementes, polpas e cascas, entretanto, foram encontradas apenas nas cascas, conforme demonstrado na Tabela 1. O teor de antocianinas foi

significativamente maior na casca 5 ($p < 0,05$), que corresponde ao estágio mais maduro, e o menor teor foi verificado no estágio totalmente verde.

O teor de taninos foi significativamente maior ($p < 0,05$) nas sementes do que nas cascas, não sendo detectados nas polpas. A semente 1 apresentou o maior teor de taninos; a casca 2 o menor teor, não apresentando diferença estatística quando comparada às cascas 1 e 3.

3.2. Atividade antioxidante

Os extratos de sementes apresentaram atividade antioxidante muito forte pelo método de sequestro do radical livre DPPH, além disso, os valores do IAA das sementes foram significativamente maiores ($p < 0,05$) que o valor do resveratrol (Tabela 2). Também foi observado que o IAA diminui com a maturação das uvas, tanto nas sementes quanto na casca, mostrando uma possível relação com o teor de fenólicos totais. Por outro lado, a atividade antioxidante foi classificada como moderada na casca 1 (IAA entre 0,5 e 1,0), e fraca nas demais amostras de casca, na qual houve uma redução do teor de substâncias fenólicas totais. Na avaliação pelo método de redução do íon férrico (FRAP), resultados similares foram observados. Não houve diferença significativa na atividade dos extratos das sementes 1 e 2 com o resveratrol, confirmando a forte atividade antioxidante. Além disso, também foi observada uma redução significativa da atividade (aumento do IR_{50}) com o avanço da maturação das uvas (Tabela 2).

Os resultados da atividade antioxidante avaliada pelo método ABTS mostraram que, como nos métodos anteriores, os extratos das sementes apresentaram significativamente maior atividade que os extratos da casca ($p < 0,05$). Também foi observado que a atividade antioxidante diminui com a maturação das uvas (aumento do IR_{50}), tanto nas sementes quanto na casca. Por outro lado, o resveratrol apresentou valor de IR_{50} significativamente menor que os extratos de sementes, apesar dos valores serem próximos.

A porcentagem do índice de inibição (I%) do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foi significativamente maior na semente 2 (72,1 ± 1,3) quando comparadas às sementes com maior grau de maturação, sugerindo que ela possa conter alguma substância, responsável por essa atividade, que a diferencie das demais. As cascas não apresentaram diferença estatisticamente significativa (p > 0,05) pelo método de inibição do peróxido de hidrogênio, conforme demonstrado na Tabela 2 .

Tabela 2. Atividade antioxidante dos extratos da uva híbrida Máximo (IAC 138-22) pelos métodos DPPH, FRAP, ABTS e H₂O₂.

	DPPH (IAA)	FRAP (IR ₅₀) ¹	ABTS* (IR ₅₀) ¹	H₂O₂ (I%) ²
Semente 1	4,7 ± 0,0a	5,1 ± 0,5a	5,3 ± 0,4b	49,3 ± 1,0c
Semente 2	4,5 ± 0,1b	5,3 ± 0,1a	5,6 ± 0,1b	72,1 ± 1,3b
Semente 3	3,6 ± 0,0c	7,6 ± 0,1b	7,9 ± 0,5c	9,0 ± 0,1d
Semente 4	3,2 ± 0,0d	11,0 ± 0,2c	11,9 ± 1,0d	5,8 ± 2,4de
Semente 5	3,3 ± 0,0d	10,8 ± 0,9c	9,5 ± 0,5c	9,3 ± 3,8d
Casca 1	0,8 ± 0,0f	23,8 ± 0,6d	50,0 ± 2,9e	2,1 ± 0,6e
Casca 2	0,4 ± 0,0g	45,8 ± 0,2e	72,3 ± 0,5f	1,7 ± 0,1e
Casca 3	0,2 ± 0,0h	98,1 ± 2,3g	144,8 ± 10,1g	4,1 ± 0,5e
Casca 4	0,3 ± 0,0h	78,2 ± 1,5f	130,6 ± 3,8g	5,2 ± 1,1de
Casca 5	0,3 ± 0,0h	65,4 ± 2,1f	126,2 ± 8,9g	4,1 ± 0,2e
Polpa 1	< 0,01	729,6 ± 13e	> 1000	NA
Polpa 2	< 0,01	> 1000	> 1000	NA
Polpa 3	< 0,01	> 1000	> 1000	NA
Polpa 4	< 0,01	> 1000	> 1000	NA
Polpa 5	< 0,01	> 1000	> 1000	NA
Resveratrol	1,5 ± 0,1e	5,6 ± 0,6a	3,3 ± 0,0a	86,8 ± 2,3 ^a

¹ Resultados expressos em µg/mL. Diferentes letras na mesma coluna representam diferenças significativas (p < 0,05). ² Extratos avaliados na concentração de 1000 µg/mL e o resveratrol na concentração de 250 µg/mL. NA: sem atividade.

Os resultados mostraram que a polpa das uvas, independentemente do estágio de maturação, apresentou atividade antioxidante desprezível em todos os métodos avaliados, que pode ser observada na Tabela 2.

No presente trabalho foi verificado um elevado grau de correlação entre o teor de substâncias fenólicas totais presentes nos extratos de semente e casca, com os métodos de atividade antioxidante, como pode ser visualizado nas Tabelas 3 e 4, exceto para sequestro do peróxido de hidrogênio ($r = -0,70$) que apresentou moderada correlação para cascas.

Tabela 3. Matriz de correlação para as amostras de sementes de uvas.

	CFT ¹	IAA ²	H ₂ O ₂	ABTS	FRAP
CFT	1				
IAA	0,95	1			
H ₂ O ₂	0,77	0,90	1		
ABTS	-0,82	-0,94	-0,83	1	
FRAP	-0,86	-0,95	-0,85	0,95	1

¹ CTF: Conteúdo total de fenólicos. ² Índice de atividade antioxidante.

As antocianinas apresentaram elevada correlação com o método de inibição do peróxido de hidrogênio ($r = 0,95$), indicando, dessa forma, que as antocianinas poderiam ser mais eficazes no sequestro desses radicais, visto que ambos coeficientes são maiores quando comparados com os coeficientes das substâncias fenólicas totais (Tabela 4). O teste de correlação (Tabela 4) demonstrou moderada correlação ($-0,79$) entre o conteúdo total de antocianinas e o conteúdo total de fenólicos, por outro lado, foi verificada uma forte correlação ($0,99$) entre a atividade antioxidante avaliada pelo índice de atividade antioxidante (IAA) e o teor de fenólicos, o que poderia sugerir que a atividade antioxidante das cascas está fortemente correlacionada aos outros fenólicos encontrados na casca e não apenas à presença das antocianinas.

Tabela 4. Matriz de correlação para as amostras de cascas de uvas.

	CFT ¹	ACY ²	IAA ³	H ₂ O ₂	ABTS	FRAP
CFT	1					
ACY	-0,79	1				
IAA	0,99	-0,71	1			
H ₂ O ₂	-0,70	0,95	-0,61	1		
ABTS	-0,92	0,92	-0,89	0,88	1	
FRAP	-0,90	0,79	-0,91	0,79	0,96	1

¹CTF: Conteúdo total de fenólicos. ²Conteúdo total de antocianinas. ³ Índice de atividade antioxidante.

3.3. Viabilidade celular

Os extratos de sementes, cascas e polpas da uva híbrida Máximo em diferentes estádios de maturação foram testados na concentração de 100 µg/mL para avaliar seus efeitos sobre a viabilidade celular *in vitro* utilizando o ensaio colorimétrico do MTT em duas linhagens celulares, macrófagos RAW 264,7 e células de câncer de pele - MV3 (melanoma). Todos os extratos testados não apresentaram efeito citotóxico para as linhagens testadas (Figura 2). Portanto, após delinear a faixa de concentração que não apresentou atividade citotóxica, procedeu-se com os ensaios *in vitro*, sempre respeitando concentrações iguais ou inferiores a 100 µg/mL. O resveratrol, utilizado como controle positivo, apresentou citotoxicidade de 96,5% e 42,6% para a linhagem de macrófagos e MV3, respectivamente, na concentração de 100 µg/mL.

3.4. Quimioprevenção de câncer

O Instituto Nacional do câncer (NCI), baseado em evidências, preconizou que ensaios quimiopreventivos devem ser testados na concentração de 20 µg/mL, uma vez que concentrações acima desse valor poderiam gerar efeitos indesejáveis à saúde. De acordo com essas recomendações e mediante os testes negativos para citotoxicidade, foram realizados os experimentos de indução da quinona redutase, atividade inibitória de NFκ-B induzido por TNF-

α e atividade inibitória da aromatase. Todos os extratos de sementes, cascas e polpas testados para quinona redutase apresentaram valor de inibição igual a 1, que estaria de acordo com níveis basais, porém esses valores deveriam ser, no mínimo, o dobro do valor encontrado no metabolismo basal, que seria equivalente a 2 [24, 25].

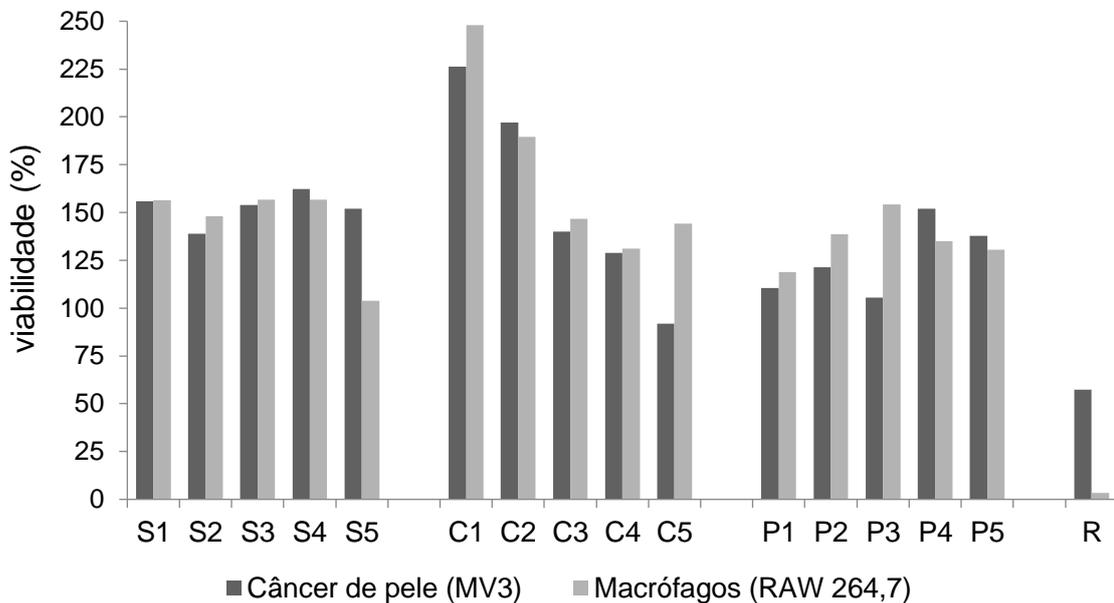


Figura 2. Efeitos dos extratos de semente, casca e polpa da uva híbrida Máximo (IAC 138-22), e resveratrol (R) na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ sobre a viabilidade de células de macrófagos RAW 264,7 e células de câncer de pele MV3 após 24 h de exposição avaliado pelo ensaio colorimétrico do MTT. Os resultados foram expressos em porcentagem média de células viáveis comparadas ao grupo controle de três experimentos independentes.

Destacam-se os valores encontrados no ensaio de inibição do NF κ -B: 24,1 (casca 2), 22,7 (semente 3) e 19,0 (semente 2), que embora apresentem inibição, não podem ser considerados como extratos quimiopreventivos, uma vez que um resultado aceitável seria encontrar valores acima de 50% [29].

Ao considerar a inibição da enzima aromatase, os principais resultados foram encontrados na semente 3 (68%), seguido da polpa 1 (48%), semente 2 (13%) e semente 1 (5%). Apesar da semente 3 apresentar um valor apreciável, deve-se esclarecer que para este ensaio, os valores considerados satisfatórios são os valores acima de 80% [30]. As atividades

quimiopreventivas de câncer realizadas a partir dos testes de quinona redutase, NFκ-B e aromatase não apresentaram os resultados esperados.

4. DISCUSSÃO

As substâncias fenólicas podem ser encontradas na casca, polpa e sementes dos frutos. Estudos prévios relataram que extratos de sementes de uva apresentaram conteúdo elevado de substâncias fenólicas e alta atividade antioxidante quando comparados com os extratos da casca, corroborando com os resultados do presente estudo [31, 32]. Farhadi et. al. [9] demonstraram que a quantidade dessas substâncias fenólicas diminui à medida que ocorre o amadurecimento da uva, tendo o maior acúmulo de substâncias fenólicas quando a uva está verde, confirmando os resultados do presente estudo. Em outros estudos prévios, sementes de uva apresentaram uma redução significativa no conteúdo de catequinas, procianidinas e flavanonas durante a maturação [33, 34].

Pulido et al. [34] constataram que mais de vinte substâncias fenólicas encontradas nas variedades de *Vitis vinifera* da Espanha decresceram ao longo da maturação das sementes das uvas, o que está relacionado às reações de polimerização que ocorrem durante este período. Essas reações de polimerização podem explicar a diminuição dos taninos ao longo da maturação das sementes [35]. Em outro estudo prévio, foram comparadas cinco variedades de uvas da região de Dão (Portugal) e os resultados demonstraram que a concentração de fenólicos variou significativamente dependendo da variedade da videira, do grau de maturação, do tamanho das bagas e de fatores ambientais, como o clima [3]. Além disso, estudos mostram que a quantidade dos fenólicos nas cascas das uvas ainda pode variar conforme as condições de cultivo, a composição do solo, o clima, a origem geográfica, as práticas de cultivo, bem como a exposição a doenças fúngicas [7, 36].

O presente estudo encontrou antocianinas presentes apenas nas cascas da uva híbrida Máximo (IAC 138-22), corroborando com estudo de Samoticha, Wojdylo e Golis [5], que

apontou que na grande maioria dos cultivares de uvas vermelhas, as antocianinas são sintetizadas apenas na casca, desempenham um papel importante na proteção contra infecções fúngicas e bacterianas e contribuem com características organolépticas e sensoriais além de possuírem fortes propriedades antioxidantes [37]. De acordo com Fraige, Pereira-Filho, e Carrilho [7], o teor de antocianinas da uva Máximo, quando comparado às uvas Syrah, Cabernet Sauvignon e Merlot (ambas da espécie *Vitis vinifera*), apresentou um conteúdo 10 vezes superior às outras uvas testadas.

De acordo com Gowrisankar e Clark [38], a relação das espécies reativas de oxigênio (EROs) e dos radicais livres está bem estabelecida em lesão celular e doenças relacionadas ao processo de envelhecimento, bem como os benefícios dos antioxidantes naturais e os seus efeitos sobre a saúde têm sido extensamente explorados ao longo dos últimos anos. Confirmando esses dados, muitos estudos indicam que doenças, como câncer, doenças cardiovasculares (DCVs) e o envelhecimento, estão associadas ao estresse oxidativo causado pelo desequilíbrio entre os oxidantes e antioxidantes no organismo [9, 39].

Considerando a forte atividade antioxidante comprovada pelos resultados dos métodos testados no presente trabalho, principalmente das sementes da uva Máximo, esses dados sugerem possíveis efeitos benéficos à saúde no sentido de minimizar os danos oxidativos que podem causar certos tipos de câncer e de doenças degenerativas, como as doenças cardiovasculares [40], redução do stress oxidativo e retardo do envelhecimento [41]. Doshi et al. [37] comprovaram que as sementes, bem como as cascas e o caule das uvas possuíam propriedades antioxidantes elevadas. Além disso, poderiam ser usadas para o tratamento de diabetes tipo 2. Habauzit e Morand [40] provaram que os compostos antioxidantes são os principais atuantes na redução significativa de ações prejudiciais das EROs por neutralizá-los.

Os resultados dos testes de viabilidade celular demonstraram que os extratos não apresentaram efeitos citotóxicos até a concentração de 100 µg/mL. Os efeitos citotóxicos observados para o resveratrol corroboram com os dados da literatura [42].

De acordo com Tomoaia et al. [42], a combinação de resveratrol com a doxorubicina produziu uma diminuição do número de células tumorais HeLa (linhagem de tumor cervical), e uma discreta alteração no formato delas. Além disso, observou-se aumento da morte celular confirmado pela diminuição da formação dos cristais de formazana, tanto pelas células tratadas apenas com resveratrol ou combinado com doxorubicina, em linhagem de tumor cervical, o que representou grande avanço para o tratamento desses tumores, uma vez que a doxorubicina é um medicamento potente, porém com alguns efeitos colaterais. A utilização do resveratrol e dessa combinação permitiria uma menor dosagem de doxorubicina e comprovaria o efeito quimiopreventivo do resveratrol [42].

Estudo recente demonstrou a eficácia de extratos de sementes de uva combinados com resveratrol (obtido dos compostos bioativos da uva) para prevenção e/ou terapia contra o câncer de cólon [43]. Outro estudo produziu uma matriz de quitosana biocompatível carregada com extratos de sementes de uva que foi capaz de aumentar o efeito antitumoral, sugerindo ser um possível fármaco inovador [44]. Kijima et al. [45] demonstraram que extratos de sementes de uva que continham dímeros de procianidinas foram potentes inibidores da atividade enzimática da aromatase, suprimindo a produção de estrogênio no câncer de mama. Além disso, os pesquisadores conseguiram comprovar que o consumo dos extratos de semente de uva suprimiu o crescimento do tumor de mama que expressa a aromatase *in vivo*. A inibição seletiva da aromatase constitui um relevante alvo na procura de agentes quimiopreventivos que sejam capazes de agir contra câncer hormônio-dependente [30]. No presente estudo a semente 3 apresentou 68% de inibição da aromatase, indicando que o extrato bruto contém algumas substâncias bioativas que demonstraram ter ação sobre a inibição dessa enzima. Faz-se necessário o isolamento dessas substâncias para prosseguir com as investigações.

5. CONCLUSÃO

Os resultados indicaram que a maturação dos frutos influenciou significativamente o conteúdo de fenólicos, cujos maiores teores foram encontrados nos estádios de maturação mais verde. As sementes da uva híbrida Máximo (IAC 138-22) apresentaram o maior teor de fenólicos totais, sendo mais elevado na semente 1 ($217,2 \pm 1,9$) e menor na semente 5 ($132,5 \pm 0,5$). Nas cascas, o maior valor encontrado foi na casca 1 ($51,0 \pm 3,7$) e as cascas 3, 4 e 5 apresentaram os menores valores ($16,7 - 19,8$), sem diferença estatística. As antocianinas, conforme esperado, foram encontradas apenas nas cascas das uvas estudadas apresentando maiores valores no estágio mais maduro, cuja coloração apresentou-se mais intensa, visualmente, na casca 5. Os ensaios antioxidantes confirmaram o potencial efeito antioxidante das sementes e cascas, comprovados pelos diferentes métodos estudados e altamente correlacionados ao conteúdo total de fenólicos. Dentre as sementes, a semente 1 apresentou a melhor atividade quando comparada ao resveratrol pelo método DPPH e atividade semelhante pelo método FRAP. Por outro lado, os resultados demonstraram que a polpa das uvas, independentemente do estágio de maturação, apresentou atividade antioxidante desprezível em todos os métodos avaliados. As atividades quimiopreventivas de câncer realizadas a partir dos testes de quinona redutase, NFK-B e aromatase não apresentaram os resultados esperados.

Esse estudo torna-se relevante à medida que até o presente momento não há trabalho que tenha realizado análises para confirmar a atividade antioxidante e quimiopreventiva de câncer dessa uva híbrida Máximo (IAC 138-22), que é produzida no Brasil, em alguns estados, inclusive no Espírito Santo.

6. REFERÊNCIAS

[1] Xia, EQ. Deng, GF. Guo, YJ. Li, HB. Biological Activities of Polyphenols from grapes. Int J Mol Sci. 11 (2010) 622-646.

- [2] Avila, P. E. A. Murrieta, M. S. V. Hernández, M. O. F. Cortéz, M. S. L. Relationship between elemental composition of grapeyards and bioactive compounds in the Cabernet Sauvignon grapes *Vitis vinifera* harvested in México. *Food Chem.* 23(1) (2016) 79-85.
- [3] Silva, L. R. Queiroz, M. Bioactive compounds of red grapes from Dão (Portugal): Evaluation of phenolic and organic profile. *Asian Pac J Trop Med.* 6(4) (2016) 315-321.
- [4] Zhang, P. Fuentes, S. Siebert, T. Krstic, M. Herderich, M. Barlow, E. W. R. Howell, K. Terpene evolution during the development of *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz grapes. *Food Chem.* 204(1) (2016) 463-474.
- [5] Samoticha, J. Wojdylo, A. Golis, T. Phenolic composition, physicochemical properties and antioxidant activity of interspecific hybrids of grapes growing in Poland. *Food Chem.* 215(1) (2017) 263-273.
- [6] Miranda, S. L. Martínez, A. S. Sánchez, P. H. Guardiola, L. Sánchez, H. P. Fortea, I. Gabaldón, J. A. Delicado, E. N. Use of cyclodextrins to recover catechin and epicatechin from red grape pomace. *Food Chem.* 203(1) (2016) 379-385.
- [7] Fraige, K. Pereira-Filho, E. R. Carrilho, E. Fingerprinting of anthocyanins from grape produced in Brazil using HPLC-DAD-MS and exploratory analysis by principal component analysis. *Food Chem.* 145(1) (2014) 395-403.
- [8] Fernández, K. Vega, M. Aspé, E. An enzymatic extraction of proanthocyanidins from *País* grape seeds and skins. *Food Chem.* 168(1) (2015) 7-13.
- [9] Farhadi, K. Esmailzadeh, F. Hatami, M. Forough, M. Molaie, R. Determination of phenolic compounds content and antioxidant activity in skin, pulp, seed, cane and leaf of five native grape cultivars in West Azerbaijan province, Iran. *Food Chem.* 199(1) (2016) 847-855.

- [10] Steward, W. P. Brown, K. Cancer chemoprevention: a rapidly evolving field. *Brit J Cancer*. 109 (2013) 1-7.
- [11] Sporn, M. B. Approaches to prevention of epithelial cancer during the preneoplastic period. *Cancer Res*. 36 (1976) 2699–2702.
- [12] Kellof, G. J. Johnson, J. R. Crowell, J. A. Boone, C. W. DeGeorge, J. J. Steele, V. E. Mehta, M. U. Temeck, J. W. Schmidt, W. J. Burke, G. Greenwald, P. Temple, R. J. Approaches to the development and marketing approval of drugs that prevent cancer. *Cancer Epidem Biomar*. 4 (1995) 1-10.
- [13] Sporn, M. B. Suh, N. Chemoprevention of cancer. *Carcinogenesis*. 21(3) (2000) 525-530.
- [14] NCI (National Cancer Institute). Cancer, 2015. Disponível em: URL: <<https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer> >. Acesso 15.02.18.
- [15] Xu, C. Yagiz, Y. Zhao, L. Simonne, A. Lu, J. Marshall, M. R. Fruit quality, nutraceutical and antimicrobial properties of 58 muscadine grape varieties (*Vitis rotundifolia* Michx) grown in United States. *Food Chem*. 215(1) (2017) 149-156.
- [16] Biasoto, A. C. T. Netto, F. M. Marques, E. J. N. Silva, M. A. A. P. Acceptability and preference drivers of red wines produced from *Vitis labrusca* and hybrid grapes. *Food Res Int*. 62(1) (2014) 456-466.
- [17] EMBRAPA. Comunicado técnico 199. 2017. Disponível em: URL: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1086551/vitivinicultura-brasileira-panorama-2016>>. Acesso 27.02.18.
- [18] Guss, KL. Pavanni, S. Prati, B. Dazzi, L. Oliveira, JP. Nogueira, BV. Pereira, TMC. Fronza, M. Endringer, DC. Scherer, R. Ultrasound-assisted extraction of *Achyrocline*

satureioides prevents contrast-induced nephropathy in mice. *Ultrason Sonochem.* 37 (2017) 368-374.

[19] Singleton, V. L. Orthofer, R. Lamuela-Raventos, R. M. Analysis of total phenols and others oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Method Enzymol.* 299(1) (1999) 152-178, modificado.

[20] Krepsky, PB. Isidório, RG. Filho, JDS. Côrtes, SF. Braga, FC. Chemical composition and vasodilatation induced by *Cuphea carthagenensis* preparations. *Phytomedicine.* 19 (2012) 953-957, modificado.

[21] Giusti, M. M. Wrolstad, R. E. Characterization and measurement by UV-visible spectroscopy. *Current protocols in Food Anal Chem.* (2001) F1.2.1-F1.2.13.

[22] Scherer, R. Godoy, H. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chem.* 112(1) (2009) 654-658.

[23] Benzie, I. F. Strain, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal Biochem.* 239(1) (1996) 70-76.

[24] Re, R. Pellegrini, N. Pannala, A. Yang, M. Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio Med.* 26(1) (1999) 9-10.

[25] Pick, E. Keisari, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods.* 38(1505) (1980) 161-170.

[26] Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* (65) (1983) 55-63.

- [27] Prochaska, H. J. Santamaria, A. B. Direct measurement of NAD(P)H: quinone reductase from cell cultured in microtiter wells: a screening assay for anticarcinogenic enzymes inducers. *Anal Biochem.* 169(1) (1988) 328-336.
- [28] Gerhauser, C., You, M., Liu, J., Moriarty, R. M., Hawthorne, M., Mehta, R. G., Moon, R. C., & Pezzuto, J. M. Cancer Chemopreventive Potential of Sulforaphane, a Novel Analogue of Sulforaphane That Induces Phase 2 Drug-metabolizing Enzymes. *Cancer Res.* 57(1) (1997) 272-278.
- [29] Homhual, S., Bunyaphatsara, N., Kondratyuk, T. P., Santarsiero, B. D., Mesecar, A. D., Herunsalee, A., Chaukul, W., Pezzuto, J. M., Fong, H. H. S., & Zhang, H. J. Bioactive Dammarane triterpenes from the mangrove plant *Bruguiera gymnorrhiza*. *J Nat Prod.* 69(1) (2006) 421 – 424.
- [30] Pezzuto, J. M., Kosmeder, J. W., Park, E. J., Lee, S. K., Cuendet, M., Baht, K., Grubjesic, S., Park, H. S., Mata-Greenwood, E., Tan, Y., Yu, R., Lantvit, D. D., & Kinghor, N. A. D. (2005). Characterization of Natural Product Chemopreventive-Agents. *Cancer Chemoprevention.* 2(1) (2005) 3-37.
- [31] Rockenbach, I. I. Gonzaga, L. V. Rizelio, V. M. Gonçalves, A. E. S. S. Genovese, M. I. Fett, R. Phenolic compounds and antioxidant activity of seed and skin extracts of red grape (*Vitis vinifera and Vitis labrusca*) pomace from Brazilian winemaking. *Food Res Int.* 44(1) (2011) 897-901.
- [32] Santos, L. P. Morais, D. R. Souza, N. E. Cottica, S. M. Boroski, M. Visentainer, J. V. Phenolic compound and fatty acids in different parts of *Vitis labrusca and V. vinifera* grapes. *Food Res Int.* 44(1) (2011) 1414-1418.

- [33] Gallego, R. F. Marino, M. G. Hierro, J. M. H. Gonzalo, J. C. R. Bailón, M. T. E. Statistical correlation between flavonolic composition, colour and sensorial parameters in grape seed during ripening. *Anal Chim Acta*. 660(1) (2010) 22-28.
- [34] Pulido, F. J. R. Gallego, R. F. Miret, M. L. G. Gonzalo, J. C. R. Bailón, M. T. E. Heredia, F. J. Preliminary study to determine the phenolic maturity stage of grape seeds by computer vision. *Anal Chim Acta*. 732(1) (2012) 78-82.
- [35] Downey, M. O. Harvey, J. S. Robinson, S. P. Analysis of tannins in seeds and skins of Shiraz grapes throughout berry development. *Aust J Grape Wine R*. 9 (2003) 15-27.
- [36] Çetin, E. S. Altinoz, D. Tarçan, E. Baydar, N. G. Chemical composition of grape canes. *Ind Crop Prod*. 34(1) (2011) 994-998.
- [37] Doshi, P. Adsule, P. Banerjee, K. Oulkar, D. Phenolic compounds, antioxidant activity and insulin tropic effect of extracts prepared from grape (*Vitis vinifera* L.) by products. *J Food Sci Tech*. 52 (2015) 181–190.
- [38] Gowrisankar, Y. Clark, M. A. Angiotensin II induces interleukin-6 expression in astrocytes: Role of reactive oxygen species and NF- κ B. *Mol Cell Endocrinol*. 437(1) (2016) 130-141.
- [39] Karacabey, E. Mazza, G. Optimization of antioxidant activity of grape cane extracts using response surface methodology. *Food Chem*. 119(1) (2010) 343-348.
- [40] Habauzit, V. Morand, C. Evidence for a protective effect of polyphenols-containing foods on cardiovascular health: An update for clinicians. *Ther Adv Chronic Dis*. 3 (2012) 87-106.
- [41] Rossi, S. P. Windschuettl, S. Matzkin, M. E. Rey-Ares, V. Terradas, C. Ponzio, R. Puigdomenech, E. Levalle, O. Calandra, R. S. Mayerhofer, A. Frungieri, M. B. Reactive oxygen species (ROS) production triggered by prostaglandin D2 (PGD2) regulates lactate

dehydrogenase (LDH) expression/activity in TM4 Sertoli cells. *Mol Cell Endocrinol.* 434(1) (2016) 154-165.

[42] Tomoaia, G. Horovitz, O. Mocanu, A. Nita, A. Avram, A. Racz, C. P. Soritau, O. Cenariu, M. Tomoaia-Cotisel, M. Effects of doxorubicin mediated by gold nanoparticles and resveratrol in two human cervical tumor cell lines. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 135 (2015) 726-734.

[43] Reddivari, L. Charepalli, V. Radhakrishnan, S. Vadde, R. Elias, R. J. Lambert, J. D. Vanamala, J. K. P. Grape compounds suppress colon cancer stem cells in vitro and in a rodent model of colon carcinogenesis. *BMC Complement Altern Med.* 16: 278 (2016) 1-12.

[44] Iannone, M. Mare, R. Paolino, D. Gagliardi, A. Froiio, F. Cosco, D. Fresta, M. Characterization and *in vitro* anticancer properties of chitosan-microencapsulated flavan-3-ols-rich grape seed extracts. *Int J Biol Macromol.* 104(A) (2017) 1039-1045.

[45] Kijima, I. Phung, S. Hur, G. Kwok, S-L. Chen, S. Grape seed extract is an aromatase inhibitor and a suppressor of aromatase expression. *Cancer Res.* 66(11) (2006) 5960-5967.