

**Isabela Maia Toaldo**

**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**

**Florianópolis  
2016**



**Isabela Maia Toaldo**

**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**

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

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marilde T. Bordignon Luiz

Coorientador: Prof. Dr. Edson Luiz da Silva

**Florianópolis  
2016**

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

Toaldo, Isabela Maia

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 /  
Isabela Maia Toaldo ; orientadora, Marilde T. Bordignon  
Luiz ; coorientadora, Edson Luiz Da Silva. - Florianópolis,  
SC, 2016.

201 p.

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

Inclui referências

1. Ciência dos Alimentos. 2. Polifenóis. 3. Propriedades  
bioativas. 4. Suco de uva. 5. *Vitis labrusca* L. . I.  
Bordignon-Luiz, Marilde T. . II. Da Silva, Edson Luiz. III.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós  
Graduação em Ciência dos Alimentos. IV. Título.

**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**

**Por**

**Isabela Maia Toaldo**

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

**Florianópolis, 25 de fevereiro de 2016**

---

**Prof<sup>ª</sup> Dra Roseane Fett  
Coordenador**

**Banca Examinadora:**

---

**Prof<sup>ª</sup> Dra Marilde Terezinha Bordignon Luiz  
Orientador (UFSC)**

---

**Prof. Dr. Giuliano Elias Pereira  
Membro (EMBRAPA - PE)**

---

**Prof. Dr. Marcos dos Santos Lima  
Membro (IF Sertão - PE)**

---

**Prof<sup>ª</sup> Dra Edna Regina Amante  
Membro (UFSC)**

---

**Prof<sup>ª</sup> Dra Carmen Maria Olivera Müller  
Membro (UFSC)**



*Dedico aos meus pais, pelo  
inestimável presente: a educação que  
não está nos livros.*





## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Júlio César e Natália Maria, e ao meu irmão Augusto, pelo amor, carinho e compreensão incondicionais. Agradeço eternamente por me ensinarem, desde a minha infância, o poder da palavra e da escrita. Vocês me inspiram sempre.

Ao meu noivo Jefferson, pelo amor e cumplicidade, pela dedicação e paciência no meu longo caminho de aprendizagem em meio aos seus ensinamentos de Química. Você sempre foi a minha motivação.

À minha querida orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marilde T. Bordignon Luiz, pela amizade, parceria e constante orientação durante a realização dos trabalhos. Agradeço, desde sempre, pela confiança, e principalmente, pelas valiosas lições e correções ao longo da minha vida acadêmica. É uma eterna honra ter sido sua aluna.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Edson Luiz da Silva, por sua excepcional contribuição nesta pesquisa e pela oportunidade concedida a mim de recordar as prazerosas práticas das Ciências Farmacêuticas. Suas explicações e ensinamentos, sempre na linguagem culta, jamais serão esquecidos.

A todos da querida Família Poggere, por terem me acolhido com amável presteza e simpatia. Agradeço imensamente por me permitirem estudar este tão rico produto, o suco de uva, um orgulho da nossa região Sul do Brasil. Este trabalho não seria possível sem sua participação.

À Empresa de Pesquisa e Extensão Agropecuária de Santa Catarina-EPAGRI/Videira, de destacada atuação na viticultura brasileira, pelo auxílio técnico e doação das amostras de uva, objeto valioso desta pesquisa.

Ao Dr. Giuliano Elias Pereira, por nos conceder a honra de sua participação como relator da tese. Sua experiência e suas contribuições são enriquecedoras deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, pelo aceite de participação. Suas contribuições são imprescindíveis para a excelência deste trabalho.

Agradeço aos colegas e amigos do Laboratório de Bioquímica de Alimentos da UFSC, Isabel, Saionara, Daiane, Vivian, Trilícia, Vinícius, Nayla, Carla, Daniele, Carolina, Ingrid e Aline, pela amizade e constante incentivo, e pelos aprendizados e conquistas compartilhados. Em especial, agradeço imensamente à Gabriela e ao Odinei, pela

inestimável participação e auxílio no planejamento e execução das atividades realizadas.

Aos professores e funcionários deste Programa de Pós-Graduação, pelos constantes ensinamentos ao longo de minha formação e por todo apoio nas diversas etapas, permitido a concretização desta pesquisa. Em especial, agradeço saudosamente ao Prof. Dr. Paulo José Ogliari, *In Memoriam*, pelas eficientes e inesquecíveis lições de estatística.

Agradeço aos colegas do Laboratório de Lipídeos, Radicais Livres e Antioxidantes da UFSC, Alyne, Heloísa, Brunna, Antônio, Vitor e Thaísa, por todo apoio e disponibilidade prestados a mim; em especial, agradeço de coração às minhas queridas amigas Fernanda e Tatiana, pela dedicação e preciosa amizade.

Aos nossos estimados colaboradores do Laboratório de Espectrometria Atômica e de Massa da UFSC, Prof. Dr. Daniel L.G. Borges e Dr. Jefferson S. de Gois, pela eficiência e indispensáveis contribuições na análise elementar dos sucos e em diversas etapas deste trabalho.

*To Prof. Dr. John Van Camp, for accepting me in this prestigious institution, the Ghent University (UGent). Most importantly, thank you for providing me with a new and fascinating topic to develop my research, which I have embraced contentedly.*

*To my friends of the Research Group Food Chemistry and Human Nutrition of UGent, Evelien, Bea, Ting, Pratheeba, Analice, Bo, Gustavo, Silvia, Monica, Phuong, Mary, Sofie, Margot and Bao, for your kindness, our talks and good moments. I'm immensely grateful to Charlotte, Senem and Bryan, you were all scientific angels in my life. Bedankt iedereen voor een heel productief en aangenaam jaar. Groetjes!*

A todos que de alguma forma contribuíram para a concretização deste trabalho, meu humilde e eterno: muito obrigada!

## RESUMO

As propriedades bioativas de compostos fenólicos são bastante estudadas em vinhos e uvas *V. vinifera* L. Entretanto, variedades *V. labrusca* L., amplamente cultivadas no Brasil e principalmente destinadas à produção do suco de uva, representam uma atrativa fonte de compostos fenólicos. Os objetivos deste trabalho foram avaliar a influência da adição de sementes de uva e de enzimas pectinolíticas no teor de compostos fenólicos, na atividade antioxidante *in vitro* e no teor de macro e microelementos de sucos de uva de diferentes variedades *V. labrusca* L. cultivadas na região Sul do Brasil; e avaliar suas propriedades bioativas *in vitro* e *in vivo*. Nas etapas de elaboração experimental dos sucos, os efeitos da adição de sementes de uva e de pectinases foram avaliados em sucos de uvas Bordô, Concord e Isabel. Para a avaliação do potencial bioativo, foram empregados sucos de uvas industrializados produzidos na região da Serra Gaúcha, RS, Brasil. Sucos de uva tintos e branco foram caracterizados quanto às composições fenólica e elementar e à atividade antioxidante *in vitro*. O efeito do consumo agudo de sucos de uva orgânico e convencional sobre a atividade antioxidante e marcadores de estresse oxidativo em indivíduos saudáveis foi avaliado através de estudo de intervenção controlado randomizado. Em estudo com células humanas, os efeitos bioativos do *trans*-resveratrol (RSV) foram investigados quanto a mecanismos oxidativos envolvidos na disfunção endotelial, através de cocultura de células intestinais Caco-2 e endoteliais EA.hy926. A adição de sementes de uva aumentou significativamente o teor de polifenóis totais e a atividade antioxidante nos sucos, e demonstrou correlação positiva com os minerais Ca, Mg, Na, K, Mn e Zn. A otimização da atividade pectinolítica através da metodologia de superfície de resposta gerou um aumento na extração de minerais e polifenóis nos sucos, demonstrando correlação positiva entre as variáveis. As condições otimizadas da extração de polifenóis foram estimadas pelo modelo nas concentrações enzimáticas de 1,30 e 1,57 g L<sup>-1</sup>, nas temperaturas de 46,8 e 54,8 °C, respectivamente. A caracterização dos sucos de uva industrializados demonstrou maior concentração de polifenóis totais, antocianinas monoméricas, *trans*-resveratrol, Mg e Mn, e maior atividade antioxidante *in vitro* no suco de uva orgânico. O consumo agudo de sucos de uva *V. labrusca* L. promoveu reduções significativas nos níveis séricos de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) e nas

concentrações plasmáticas de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em indivíduos saudáveis. O consumo dos sucos aumentou significativamente a capacidade antioxidante sérica e a atividade das enzimas catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD) em eritrócitos. As intervenções com os sucos não afetaram significativamente o estado glicêmico e os níveis de ácido úrico. A análise multivariada confirmou a influência das principais classes fenólicas nas respostas biológicas. Todavia, as diferenças químicas associadas aos sucos orgânico e convencional não foram um fator preditivo para seus efeitos *in vivo*. Em cultura de células, o tratamento com RSV reduziu significativamente os níveis de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), espécies reativas de oxigênio (ERO), interleucina 8 (IL-8) e molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) induzidos pelo fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), e aumentou a produção endotelial de óxido nítrico (NO). As análises por UPLC-MS/MS<sup>E</sup> revelaram a presença de RSV e quatro metabólitos conjugados. A bioatividade do RSV e seus metabólitos sobre mecanismos inflamatórios foi demonstrada pela primeira vez em cocultura. A caracterização química e os resultados *in vitro* e *in vivo* evidenciaram que os sucos *V. labrusca* L. são ricos em macro e microelementos e compostos fenólicos, com potencial bioativo na saúde humana.

**Palavras-chave:** Polifenóis. Propriedades bioativas. Suco de uva. *Vitis labrusca* L.

## ABSTRACT

The bioactive properties of polyphenols are extensively studied in wines and grapes from *V. vinifera* L. However, the *V. labrusca* L. varieties, widely cultivated in Brazil and mainly destined to grape juice production, represent an attractive source of phenolic compounds. The objectives of this study were to evaluate the influence of the addition of grape seeds and pectinolytic enzymes on the polyphenols content, antioxidant activity *in vitro* and on the macro and microelements contents in grape juices from different *V. labrusca* L. varieties grown in the South region of Brazil; and to evaluate their bioactive properties *in vitro* and *in vivo*. In the experimental preparation of juices, the effects of grape seed addition and pectinases were evaluated in Bordo, Concord and Isabel grape juices. Industrialized grape juices produced in the Serra Gaúcha Region, RS, Brazil, were used to investigate the bioactive potential. Characterization of the phenolic and elemental composition and *in vitro* antioxidant activity was performed in red and white grape juices. The effect of acute consumption of organic and conventional grape juices on antioxidant activity and oxidative stress markers in healthy subjects was evaluated through a randomized controlled intervention trial. In human cells studies, the bioactive effects of *trans*-resveratrol (RSV) towards oxidative mechanisms related to endothelial dysfunction were investigated through a co-culture of intestinal Caco-2 cells and endothelial EA.hy926 cells. Grape seed addition significantly increased the total phenolics and antioxidant capacity of juices, and was positively correlated with minerals Ca, Mg, Na, K, Mn e Zn. The optimization of pectinolytic activity through response surface methodology led to an increased extraction of minerals and phenolics in juices, and depicted a positive correlation among the variables. The optimized conditions for polyphenols extraction were estimated by the model at enzyme concentrations of 1.30 and 1.57 g L<sup>-1</sup>, at 46.8 and 54.8 °C, respectively. The characterization of industrialized grape juices showed higher concentration of total phenolics, monomeric anthocyanins, *trans*-resveratrol, Mg and Mn, and higher antioxidant activity *in vitro* in the organic grape juice. The acute consumption of *V. labrusca* L. juices promoted significant reductions on levels of hydroperoxides (LOOH) in serum and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in plasma of healthy individuals. The consumption of juices significantly augmented serum antioxidant capacity and

enzymatic activities of catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and superoxide dismutase (SOD) in erythrocytes. The interventions with grape juices did not affect significantly the glycaemic status and uric acid levels. The multivariate analysis confirmed the influence of the main phenolic classes on biological responses. However, the chemical differences associated with organic and conventional juices were not a predictive factor for its effects *in vivo*. In cell culture, RSV treatment significantly reduced the tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )-induced levels of vascular endothelial growth factor (VEGF), reactive oxygen species (ROS), interleukin 8 (IL-8) and intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) and increased the endothelial production of nitric oxide (NO). The UPLC-MS/MS<sup>E</sup> analysis revealed the presence of RSV and four conjugated metabolites. The bioactivity of RSV and its metabolites towards inflammatory mechanisms was demonstrated in a co-culture for the first time. The chemical characterization and the *in vitro* and *in vivo* results have demonstrated that *V. labrusca* L. grape juices are rich sources of macro and microelements and phenolic compounds, with bioactive potential in human health.

**Keywords:** Polyphenols. Bioactive properties. Grape juice. *Vitis labrusca* L.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

Figura 1. Principais variedades <i>V. labrusca</i> L. empregadas na elaboração de suco de uva na região Sul do Brasil. A) Bordô; B) Isabel; C) Niágara Branca. ....	44
Figura 2. Fluxograma das principais etapas de elaboração tecnológica de sucos de uva. ....	49
Figura 3. Etapas da produção tecnológica do suco de uva. A) recepção das uvas; B) separação da rãquis; C) esmagamento das bagas em desengaçadeira-esmagadeira. ....	50
Figura 4. Maceração e extração à quente do suco de uva. A) e B) aquecimento e passagem das uvas em termomaceradores tubulares; C) maceração das uvas sob agitação no interior de tanque térmico. ....	51
Figura 5. Etapas de esgotamento e prensagem na produção do suco de uva. A) separação de sólidos do suco em esgotador dinâmico; B) prensagem e remoção do bagaço (cascas e sementes). ....	52
Figura 6. Etapa de clarificação do suco de uva através de centrifugação. A) centrífuga decanter à vácuo para remoção de substâncias coloidais no suco; B) remoção do resíduo da centrifugação do suco de uva. ....	53
Figura 7. Estrutura do cátion flavílium (A) e antocianinas majoritárias em uvas <i>V. labrusca</i> L.; B) cianidina-3,5-diglicosídeo; C) malvidina-3,5-diglicosídeo. ....	64
Figura 8. Estrutura aglicona dos principais flavonóis em uvas e derivados <i>V. labrusca</i> L. A) campferol; B) quercetina; C) miricetina; D) isorhamnetina. ....	65
Figura 9. Estrutura dos flavanóis: A) principais flavanóis encontrados em uvas; B) principais proantocianidinas e seus radicais ligantes. ....	66
Figura 10. Ácidos fenólicos e estilbenos. A) ácidos fenólicos derivados dos ácidos cinâmico e benzóico; B) isômeros do resveratrol, da classe dos estilbenos. ....	68

## CAPÍTULO 2

Fig. 1. Correlation of grape seed concentration with total phenolic content and antioxidant capacity in the varietal juices. (A) Correlation between grape seed concentration and total phenolics: Correlation coefficient,  $r = 0.99, 0.97, 0.91$  (99% confidence interval,  $p < 0.01$ ); and coefficient of determination,  $r^2 = 0.913, 0.889, 0.733$  for Isabel, Concord and Bordo juices, respectively. (B) Correlation between grape seed concentration and antioxidant capacity: Correlation coefficient,  $r = 0.94, 0.82, 0.92$  (99% confidence interval,  $p < 0.01$ ); and coefficient of determination,  $r^2 = 0.758, 0.704, 0.845$  for Isabel, Concord and Bordo juices, respectively. Total phenolics expressed as gallic acid equivalent; DPPH radical scavenging activity expressed as Trolox equivalent.

(◆) Isabel; (△) Concord; (●) Bordo. ....

84

Fig. 2. Correlation between the total phenolic content and the antioxidant capacity in the varietal grape juices (*Vitis labrusca* L.). (A) Isabel juices; (B) Concord juices; (C) Bordo juices. Correlation coefficient,  $r = 0.94, 0.87, 0.94$  (99% confidence interval,  $p < 0.01$ ); and coefficient of determination,  $r^2 = 0.885, 0.875, 0.795$  for Isabel, Concord and Bordo juices, respectively. Total phenolics expressed as gallic acid equivalent; DPPH radical scavenging activity expressed as Trolox equivalent. ....

85

Fig. 3. Metal concentrations in *Vitis labrusca* L. grape juices determined by ICP-MS. (A) Isabel juices; (B) Concord juices; (C) Bordo juices. The error bars indicate the confidence interval at a confidence level of 95% ( $n = 3$ ). (○) Al; (✕) As; (\* ) Ba; (▽) Cr; (\* ) Cu; (□) Li; (◇) Ni; (▷) Sr. ....

87

## CAPÍTULO 3

Fig. 1. Response surfaces of the fitted model for the optimization of the pectinolytic activity of Everzym<sup>®</sup> Color on the extraction of polyphenols in grape juices as a function of enzyme concentration and temperature. Total phenolics (a); monomeric anthocyanins (b); antioxidant activity: ABTS (c), FRAP (d). ....

99

Fig. 2. Response surfaces for the optimization of the pectinolytic activity of Rapidase<sup>®</sup> Smart as a function of enzyme



concentration and temperature. Total phenolics (a); monomeric anthocyanins (b); antioxidant activity: ABTS (c), FRAP (d). .... 100

Fig. 3. Elemental composition and mineral content of Isabel grape juices prepared using the optimized basis of the pectinolytic activity. (a); Macronutrients; (b) Micronutrients. .... 102

## CAPÍTULO 4

Fig. 1. Chromatograms of HPLC-DAD analysis of anthocyanins profile of *V. labrusca* L. red grape juices. (A) Organic grape juice; (B) conventional grape juice. Peaks: 1: malvidin-3,5-diglucoside, RT(A/B) = 17.446/17.562; 2: delphinidin-3-*O*-glucoside, RT(A/B) = 18.598/18.701; 3: peonidin-3-*O*-glucoside, RT(A/B) = 19.891/19.980; 4: malvidin-3-*O*-glucoside, RT(A/B) = 20.464/20.543; 5: cyanidin-3,5-diglucoside, RT(A/B) = 25.163/25.241; 6: cyanidin-3-*O*-glucoside, RT(A/B) = 28.279/28.373. .... 112

Fig. 2. Changes in lipid peroxidation biomarkers in healthy subjects after the consumption of organic and conventional *V. labrusca* red grape juices. (A) LOOH = lipid hydroperoxides; (B) TBARS = thiobarbituric acid reactive species. \*Significantly different from baseline ( $*p<0.05$ ;  $**p<0.001$ ). <sup>a,b</sup>Significant difference among the intervention samples (Tukey *post hoc* test,  $p<0.05$ ). CT = control; CVGJ = conventional grape juice; OGJ = organic grape juice. .... 113

Fig. 3. Principal component analysis plot of *V. labrusca* L. grape juices and control sample over the phenolic and mineral composition, the *in vitro* antioxidant activity and the *in vivo* lipid peroxidation responses in healthy subjects. CT = control; CVGJ = conventional grape juice; OGJ = organic grape juice. .... 114

## CAPÍTULO 5

Fig. 1. Kinetics of antioxidant responses in healthy subjects after ingestion of *V. labrusca* L. red grape juice. (A) GSH = reduced glutathione; (B) TAC = serum total antioxidant capacity; (C) Glucose; (D) Uric acid. \*Significantly different from baseline (time zero;  $T_0$ ) ( $*p<0.05$ ;  $**p<0.001$ ). .... 125

Fig. 2. Variations to baseline on blood antioxidant biomarkers in the controlled intervention trial with organic and conventional tropical grape juices. (A) GSH = reduced glutathione; (B) TAC = serum total antioxidant capacity. CT = control (water); CVGJ = conventional grape juice; OGJ = organic grape juice. \*Significantly different from baseline ( $p < 0.05$ ;  $**p < 0.001$ ).<sup>a,b</sup>Significant difference among intervention samples (Tukey *post hoc* test,  $p < 0.05$ ). ..... 127

Fig. 3. Changes on antioxidant enzymes activities in relation to baseline in healthy subjects after the study interventions. (A) SOD = superoxide dismutase; (B) CAT = catalase; (C) GPx = glutathione peroxidase. CT = control (water); CVGJ = conventional grape juice; OGJ = organic grape juice. \*Significantly different from baseline ( $p < 0.05$ ;  $**p < 0.001$ ).<sup>a,b</sup>Significant difference among the intervention samples (Tukey *post hoc* test,  $p < 0.05$ ). ..... 128

Fig. 4. Principal component analysis of antioxidant responses *in vivo* and phenolic composition of tropical grape juices. Panel (A): scores plot of samples in the plane defined by the first two principal components (PC); Panel (B): loading biplot of variable-factor in the first two principal components defined by grape juice factor. CAT = catalase; CT = control (water); CVGJ = conventional grape juice; GPx = glutathione peroxidase; GSH = reduced glutathione; OGJ = organic grape juice; Serum Gluc = glucose; SOD = superoxide dismutase; TAC = serum total antioxidant capacity; TPC = total phenolic content. .... 131

## CAPÍTULO 6

Fig. 1. Cromatograma e espectro de massas da fração basolateral após transporte em células Caco-2. Cromatograma total de íons (A); 1 = *trans*-resveratrol-4'-*O*- $\beta$ -glucuronídeo, 2 = *trans*-resveratrol-4'-sulfato, 3 = *trans*-resveratrol-3-sulfato, 4 = *trans*-resveratrol-3-*O*- $\beta$ -glucuronídeo, 5 = *trans*-resveratrol. Transações *m/z*: RSV *m/z* 227,07 e seus metabolitos, sulfato *m/z* 307,03 (B) e glucuronídeo *m/z* 403,11 (C). ..... 152

Fig. 2. Atividade mitocondrial de células endoteliais em resposta ao RSV após 4 h (A) e 24 h (B) em cocultura e nos sistemas sequencial e padrão nas condições inflamatória induzida por

TNF- $\alpha$ e não inflamatória. Os resultados são expressos em porcentagem do controle ( <i>blank</i> ) da condição não inflamatória, não tratada com TNF- $\alpha$ ou RSV. ....	154
Fig. 3. Produção de NO em células endoteliais após 4 h (A) e 24 h (B) de exposição ao RSV e metabólitos, nas condições inflamatória induzida por TNF- $\alpha$ e não inflamatória. Os resultados são expressos em porcentagem do controle da condição não inflamatória. ....	156
Fig. 4. Níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio em células endoteliais em resposta ao RSV e metabólitos após 4 h (A) e 24 h (B). ....	157
Fig. 5. Secreção de quimiocinas pró-inflamatórias e do fator de crescimento endotelial vascular na cocultura de células Caco-2 e EA.hy926 durante exposição ao RSV e metabólitos. A) IL-8; B) VEGF; C) ICAM-1. ....	159



## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

Tabela 1. Limites analíticos estabelecidos pela legislação brasileira para o suco de uva. ....	39
--	----

### CAPÍTULO 2

Table 1. Operating parameters of ICP-MS. ....	82
Table 2. Effect of grape seed addition on the total phenolic content, total monomeric anthocyanins, and antioxidant capacity of grape juices of <i>Vitis labrusca</i> L. varieties Concord, Isabel and Bordo. ....	83
Table 3. Effect of grape seed addition on the elemental composition of grape juices Concord, Isabel and Bordo. Concentrations of macroelements (Na, Mg, K, Ca) are expressed in mg/L and concentrations of microelements (Mn, Fe, Zn, Co, Se) are expressed in µg/L. ....	86

### CAPÍTULO 3

Table 1. Central composite design (CCD) for the optimization of the pectinolytic activity of Everzym <sup>®</sup> Color and the predicted and observed responses for total phenolics, total monomeric anthocyanins, and <i>in vitro</i> antioxidant activity in Isabel grape juices. ....	96
Table 2. Optimization of pectinolytic activity of Rapidase <sup>®</sup> Smart in the central composite design (CCD) with the predicted and observed responses for total phenolics, total monomeric anthocyanins and <i>in vitro</i> antioxidant activity in grape juices. ....	97
Table 3. Significance tests for the response variables (total phenolics, monomeric anthocyanins, and antioxidant activity) for pectinolytic enzymes Everzym <sup>®</sup> Color and Rapidase <sup>®</sup> Smart in the statistical modeling for the phytochemical polyphenol extraction in Isabel grape juices. ....	98
Table 4. Optimized conditions of the response parameters in the statistical model of the pectinolytic activity of Everzym <sup>®</sup> Color and Rapidase <sup>®</sup> Smart on the extraction of total phenolics,	

anthocyanins and minerals, and antioxidant activity of Isabel grape juices. ....	101
--	-----

#### **CAPÍTULO 4**

Table 1. Quality parameters of the conventional and organic <i>V. labrusca</i> L. grape juices. ....	111
Table 2. Phenolic profile, organic acids and <i>in vitro</i> antioxidant activity of the <i>V. labrusca</i> L. grape juices. ....	111
Table 3. Minerals and trace elements in the organic and conventional grape juices. ....	113

#### **CAPÍTULO 5**

Table 1. Chemical composition and <i>in vitro</i> antioxidant activity of tropical grape juices used in the intervention trial. ....	122
Table 2. Variation on glucose and uric acid levels in healthy individuals at baseline and after interventions with tropical grape juices and control. ....	130

#### **CAPÍTULO 6**

Tabela 1. Modificações do RSV e metabólitos identificados por UPLC-MS/MS <sup>E</sup> após metabolismo e transporte em células Caco-2. ....	151
---	-----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	– 2,20-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
ANOVA	– Análise de Variância
CACO-2	– Células de adenocarcinoma de cólon humano
CAT	– Catalase
CLAE	– Cromatografia líquida de alta eficiência
DCC	– Delineamento composto central
DCV	– Doença cardiovascular
DPPH	– 2,2-difenil-1-picrilhidrazila
DTNB	– Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico
EA.hy926	– Células endoteliais provenientes da fusão de células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) e células de adenocarcinoma de pulmão humano linhagem A549
EC	– <i>Enzyme Commission</i>
eNOS	– Enzima óxido nítrico sintase endotelial
ERN	– Espécies reativas de nitrogênio
ERO	– Espécies reativas de oxigênio
FAAS	– Espectrometria de absorção atômica com atomização por chama
FRAP	– Poder antioxidante de redução do íon férrico
GFAAS	– Espectrometria de absorção atômica com atomização em forno de grafite
GPx	– Glutathione peroxidase
GR	– Glutathione reductase
GSH	– Glutathione reduzida
GSSG	– Glutathione oxidada
GST	– Glutathione S-transferase
ICAM-1	– Molécula de adesão intercelular 1
ICP-MS	– Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado
IFN- $\gamma$	– Interferon $\gamma$
IL-1	– Interleucina 1
IL-8	– Interleucina 8
IMC	– Índice de massa corpórea
INMETRO	– Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

LDL	– Lipoproteína de baixa densidade
LOOH	– Hidroperóxidos lipídicos
MDA	– Malondialdeído
MSR	– Metodologia de superfície de resposta
NADP	– Nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH	– Nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NF- $\kappa\beta$	– Fator de transcrição nuclear $\kappa\beta$
NO	– Óxido nítrico
OAC	– Organismos de Avaliação da Conformidade Orgânica
OCS	– Organizações de Controle Social
OMS	– Organização Mundial da Saúde
OPAC	– Organismo Participativo de Avaliação da Conformidade Orgânica
ORAC	– Capacidade de absorção de radical de oxigênio
PCA	– Análise de Componentes Principais
PG	– Poligalacturonases
PGL	– Poligalacturonato liase
PMG	– Polimetilgalacturonases
PMGE	– Polimetilgalacturonato esterase
PMGL	– Polimetilgalacturonato liase
RSV	– <i>trans</i> -Resveratrol
SPG	– Sistema Participativo de Garantia
SOD	– Superóxido dismutase
TBARS	– Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCLE	– Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TEAC	– Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox
TNF- $\alpha$	– Fator de necrose tumoral $\alpha$
TPTZ	– 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina
TROLOX	– 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromato-2-ácido carboxílico
UPLC-MS/MS <sup>E</sup>	– Cromatografia líquida de ultra eficiência com detecção por espectrometria de massas em <i>tandem</i>
VASP	– Fosfoproteína estimulada por vasodilatador
VEGF	– Fator de crescimento endotelial vascular



## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>31</b>
<b>CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>35</b>
<b>1. VITICULTURA E PRODUÇÃO DE SUCO DE UVA NO BRASIL .....</b>	<b>37</b>
<b>2. PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DE VARIEDADES V. LABRUSCA L. ....</b>	<b>40</b>
2.1. VARIEDADE BORDÔ .....	41
2.2. VARIEDADE ISABEL .....	42
2.3. VARIEDADE CONCORD .....	43
2.4. VARIEDADES NIÁGARA BRANCA E NIÁGARA ROSADA .....	43
<b>3. CULTIVO DE UVAS ORGÂNICAS E SUCO DE UVA ORGÂNICO .....</b>	<b>44</b>
<b>4. PROCESSAMENTO DO SUCO DE UVA .....</b>	<b>48</b>
4.1. ENZIMAS PECTINOLÍTICAS NA ELABORAÇÃO DO SUCO DE UVA .....	55
<b>5. COMPOSIÇÃO DA UVA E DO SUCO DE UVA .....</b>	<b>57</b>
5.1. AÇÚCARES E COMPOSTOS NITROGENADOS .....	58
5.2. ÁCIDOS ORGÂNICOS .....	59
5.3. MINERAIS .....	60
5.4. COMPOSTOS FENÓLICOS .....	63
5.4.1. COMPOSTOS FLAVONÓIDES .....	63
<i>Antocianinas</i> .....	63
<i>Flavonóis</i> .....	64
<i>Flavanóis</i> .....	65
5.4.2. ÁCIDOS FENÓLICOS E ESTILBENOS .....	67
<i>Ácidos fenólicos</i> .....	67
<i>Estilbenos</i> .....	67
<b>6. ESPÉCIES REATIVAS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE</b>	<b>69</b>
<b>7. PROPRIEDADES BIOATIVAS DE COMPOSTOS FENÓLICOS DA UVA .....</b>	<b>72</b>
7.1. POLIFENÓIS E DOENÇAS CARDIOVASCULARES .....	74
<b>8. CULTIVO DE CÉLULAS E BIODISPONIBILIDADE DE POLIFENÓIS .....</b>	<b>76</b>

**CAPÍTULO 2 – EFFECT OF GRAPE SEEDS ON THE POLYPHENOL BIOACTIVE CONTENT AND ELEMENTAL COMPOSITION BY ICP-MS OF GRAPE JUICES FROM *VITIS LABRUSCA* L. .... 79**

ABSTRACT ..... 81

**1. Introduction ..... 81**

**2. Materials and methods ..... 82**

2.1. *Chemicals and reagentes* ..... 82

2.2. *Equipments* ..... 82

2.3. *Samples* ..... 82

2.4. *Preparation of grape juices* ..... 82

2.5. *Determination of the bioactive content in grape juices – total phenolics, total monomeric anthocyanins and in vitro antioxidant capacity* ..... 82

2.6. *Determination of elemental composition by ICP-MS* ..... 83

2.7. *Statistical analysis* ..... 83

**3. Results and discussion ..... 83**

3.1. *Bioactive content of grape juices – total phenolics, total monomeric anthocyanins and in vitro antioxidant capacity* ..... 83

3.2. *Elemental analysis of grape juices* ..... 85

3.2.1. *Mineral composition* ..... 85

3.2.2. *Metal contamination* ..... 86

**4. Conclusions ..... 87**

**Acknowledgments ..... 87**

**References ..... 87**

**CAPÍTULO 3 – PHYTOCHEMICAL POLYPHENOL EXTRACTION AND ELEMENTAL COMPOSITION OF *VITIS LABRUSCA* L. GRAPE JUICES THROUGH OPTIMIZATION OF PECTINOLYTIC ACTIVITY ..... 89**

Abstract ..... 91

Introduction ..... 91

Materials and Methods ..... 92

Chemicals ..... 92

Grape Samples from *V. Labrusca* L. and the Preparation of Grape Juices ..... 92

Experimental Design ..... 93

Analytical Process for Total Phenolic Content Determination ...	94
Analysis for Total Monomeric Anthocyanins .....	94
Determination of the <i>In Vitro</i> antioxidant activity .....	94
Elemental Analysis by ICP-MS and FAAS .....	94
Statistical Analysis .....	95
<b>Results and discussion .....</b>	<b>95</b>
Effect of Experimental Variables on Phytochemical Polyphenol Extraction .....	95
Effect of Optimized Conditions of the Pectinolytic Activity on the Elemental Composition of <i>V. Labrusca</i> L. Grape Juices .....	101
<b>Conclusions .....</b>	<b>102</b>
<b>Acknowledgments .....</b>	<b>103</b>
<b>References .....</b>	<b>103</b>

**CAPÍTULO 4 – 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 .....** **105**

ABSTRACT .....	107
<b>1. Introduction .....</b>	<b>107</b>
<b>2. Materials and methods .....</b>	<b>108</b>
2.1. Chemicals .....	108
2.2. Grape samples and grape juice processing .....	108
2.3. Determination of the bioactive content in grape juices – total phenolics, total monomeric anthocyanins and <i>in vitro</i> antioxidant activity .....	109
2.4. HPLC analysis for individual phenolic compounds.....	109
2.5. Elemental analysis by ICP-MS and FAAS .....	109
2.6. <i>In vivo</i> study .....	109
2.6.1. Subjects and experimental design .....	109
2.6.2. Blood samples and analysis for lipid peroxidation biomarkers .....	110
2.7. Statistical analysis .....	110
<b>3. Results and discussion .....</b>	<b>110</b>
3.1. Quality parameters, phenolic and elemental composition of grape juices .....	110
3.2. Effect of grape juices intake on lipid peroxidation .....	112

<b>4. Conclusions .....</b>	<b>114</b>
<b>Acknowledgments .....</b>	<b>114</b>
<b>References .....</b>	<b>114</b>

**CAPÍTULO 5 – ACUTE CONSUMPTION OF GRAPE JUICES OF TROPICAL VARIETIES *V. LABRUSCA* L. ASSOCIATED WITH RAPID IMPROVEMENT OF REDOX HOMEOSTASIS AND SUSTENANCE OF GLYCAEMIC AND URATE STATUSES IN HUMANS .....** **117**

<b>Abstract .....</b>	<b>119</b>
<b>1. Introduction .....</b>	<b>120</b>
<b>2. Methods and materials .....</b>	<b>121</b>
2.1. <i>Tropical grape juices of <i>V. labrusca</i> L. ....</i>	121
2.2. <i>Participants .....</i>	121
2.3. <i>Study design .....</i>	122
2.4. <i>Blood sampling .....</i>	123
2.5. <i>Analysis of reduced glutathione and erythrocyte enzymes.....</i>	124
2.6. <i>Biochemical assays and serum total antioxidant capacity ....</i>	124
2.7. <i>Statistical analysis .....</i>	124
<b>3. Results .....</b>	<b>125</b>
3.1. <i>Kinetics of biomarkers after ingestion of <i>V. labrusca</i> L. red grape juice .....</i>	125
3.2. <i>Effect of organic and conventional red grape juices on antioxidant biomarkers .....</i>	126
3.3. <i>Glycaemic status and uric acid levels .....</i>	129
3.4. <i>Influence of grape juice polyphenols on antioxidant responses .....</i>	130
<b>4. Discussion .....</b>	<b>132</b>
<b>Acknowledgments .....</b>	<b>134</b>
<b>Conflict of interest .....</b>	<b>134</b>
<b>References .....</b>	<b>135</b>

**CAPÍTULO 6 – RESVERATROL MELHORA A DISFUNÇÃO ENDOTELIAL INDUZIDA POR TNF- $\alpha$  EM MODELO DE COCULTURA DE CÉLULAS INTESTINAIS CACO-2 E CÉLULAS ENDOTELIAIS HUMANAS .....** **141**

<b>Resumo .....</b>	<b>143</b>
<b>1. Introdução .....</b>	<b>144</b>
<b>2. Material e Métodos .....</b>	<b>145</b>
2.1. <i>Linhagens celulares e condições de cultivo .....</i>	145
2.2. <i>Ensaio de viabilidade celular .....</i>	146
2.3. <i>Configuração experimental: cocultura e sistemas sequencial e padrão .....</i>	146
2.4. <i>Testes de permeabilidade celular e resistência elétrica transepitelial (TEER) .....</i>	148
2.5. <i>Análises por UPLC-HDMS/MS<sup>E</sup> .....</i>	148
2.6. <i>Determinação de espécies reativas de oxigênio (ERO) .....</i>	148
2.7. <i>Determinação da produção endotelial de óxido nítrico (NO) .....</i>	149
2.8. <i>Ensaio imunoenzimático (ELISA) .....</i>	149
2.9. <i>Análise estatística .....</i>	150
<b>3. Resultados .....</b>	<b>150</b>
3.1. <i>Identificação dos metabólitos transportados .....</i>	150
3.2. <i>Desenvolvimento da cocultura e efeito do RSV sobre a atividade mitocondrial celular .....</i>	153
3.3. <i>Produção de NO .....</i>	155
3.4. <i>RSV e metabólitos inibem o estresse oxidativo na cocultura e no sistema sequencial .....</i>	157
3.5. <i>Efeito do RSV sobre marcadores inflamatórios na cocultura .....</i>	159
<b>4. Discussão .....</b>	<b>160</b>
<b>Referências .....</b>	<b>164</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>169</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>171</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>191</b>
<b>APÊNDICE A</b> – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. (Estudo Clínico de Intervenção em Seres Humanos). .....	191
<b>APÊNDICE B</b> – Recordatório de refeições diárias durante a restrição alimentar do estudo <i>in vivo</i> com suco de uva. ....	194
<b>ANEXOS .....</b>	<b>195</b>
<b>ANEXO A</b> – Parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina. ....	195

<b>ANEXO B</b> – Comprovante de participação e apresentação do trabalho “ <i>Elemental analysis and characterization of brazilian grape juices from Vitis labrusca L. by ICP-MS</i> ” no Winter Conference on Plasma Spectrochemistry 2014, Amelia Island, Estados Unidos. ....	197
<b>ANEXO C</b> – Comprovante de participação e apresentação oral do trabalho “ <i>Bioavailability and metabolism of grape trans-resveratrol on Caco-2 cells</i> ” no 20th National Symposium for Applied Biological Sciences, Louvain-la-Neuve, Bélgica. ....	198
<b>ANEXO D</b> – Comprovante de participação e apresentação oral do trabalho “ <i>Bioactivity of malvidin 3,5-diglucoside on endothelial cells as evidence of the antioxidant potential of V. labrusca L. grape juices</i> ” no 5th Annual BNS Congress – Adding Value to Nutrition research, Brussels, Bélgica. ....	199
<b>ANEXO E</b> – Ficha técnica da enzima comercial Everzym Color (Everintec, Itália). ....	200
<b>ANEXO F</b> – Ficha técnica da enzima comercial Rapidase Smart (DSM, Holanda). ....	201

## INTRODUÇÃO

Alimentos naturais de alta qualidade nutricional representam uma das mais importantes contribuições para saúde (FAO, 2010). A uva (*Vitis* sp.) contém uma variedade de compostos secundários com propriedades bioativas, como os compostos fenólicos ou polifenóis, que apresentam atividades antioxidante, anticarcinogênica, cardioprotetora, antimicrobiana, neuroprotetora e anti-inflamatória (FAN; LOU, 2004; ARON; KENNEDY, 2008; DAGLIA, 2011).

Derivados da uva como o suco e o vinho são importantes fontes de polifenóis na dieta humana (DANI et al., 2007). O consumo de dietas ricas em polifenóis é associado à redução do risco de doenças crônico-degenerativas como aterosclerose, cardiopatias, câncer e diabetes. Estudos epidemiológicos demonstram que esses compostos exercem efeito protetor quanto aos danos oxidativos induzidos por radicais livres em células e tecidos (O'BYRNE et al., 2002; MANACH et al., 2005).

O suco de uva é uma bebida nutritiva e não fermentada, de cor, aroma e sabor característicos, sendo bastante apreciada mundialmente (RIZZON; MENEGUZZO, 2007). No Brasil, o consumo e a comercialização de suco de uva têm aumentado nos últimos anos, devido à expansão do cultivo da fruta e da crescente demanda de mercado (MELLO, 2011).

A região Sul do Brasil é a maior produtora de uvas do país, com destacada importância na vitivinicultura nacional. As variedades americanas *Vitis labrusca* L. são amplamente cultivadas nessa região e representam mais de 80% das uvas processadas, destinadas principalmente à produção do suco de uva. Entre as variedades mais cultivadas destacam-se a Bordô e Isabel, que correspondem a cerca de 50% da produção nacional de uvas (OLIVEIRA et al., 2009; NIXDORF; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, 2010). Em 2012, foram produzidos mais de 220 milhões de litros de suco de uva nos Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina, sendo registrado aumento de 144% na comercialização nacional do produto em relação ao ano de 2004 (MELLO, 2012). Somente no primeiro semestre de 2015, cerca de 76 milhões de litros de suco de uva foram produzidos no Rio Grande do Sul (UVIBRA, 2015a).

A busca por uma alimentação mais saudável e a necessidade de cultivo menos agressivo ao meio ambiente, visando à preservação e sustentabilidade da viticultura nacional, têm contribuído para a expansão

do cultivo de uvas orgânicas e produção do suco orgânico (CAMARGO; TONIETTO; HOFFMANN, 2011).

O suco de uva, como uma bebida natural, é bastante apreciado devido às suas características sensoriais e às propriedades nutricionais e bioativas de constituintes da uva, como açúcares, minerais, ácidos orgânicos e compostos fenólicos. A composição química e fenólica do suco de uva varia de acordo com a espécie, variedade, estágio de maturação, condições climáticas, de cultivo e de processamento (RIZZON; MENEGUZZO, 2007; JACKSON, 2008). Os principais compostos fenólicos presentes no suco de uva são os flavonóides, estilbenos e os ácidos fenólicos (ROMERO-PÉREZ et al., 1999; MALACRIDA; MOTTA, 2005; JACKSON, 2008).

Em relação à uva, diversos estudos inferem sobre a composição fenólica de seus constituintes como fontes atrativas de antioxidantes naturais (MOURE et al., 2001; VOLFF; POPA, 2004; ROCKENBACH et al., 2011a; ROCKENBACH et al., 2011b; GIBIS; WEISS, 2012). A descoberta do potencial bioativo dos polifenóis motivou à utilização de enzimas como pectinases, celulasas e hemicelulasas, na degradação da parede celular vegetal e liberação de compostos fenólicos em diversos subprodutos da uva (LANDBO; MEYER, 2004; MAIER et al., 2008; CHAMORRO et al., 2012; ROMERO-CASCALES et al., 2012). Enzimas pectinolíticas são tradicionalmente utilizadas nas indústrias de sucos para reduzir a viscosidade e aumentar a eficiência de filtração e clarificação, e no tratamento preliminar da uva na atividade vitícola (WHITAKER, 1996; PARDO et al., 1999; JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005).

Os compostos fenólicos das uvas são bastante descritos na literatura, sendo extensivamente estudados em extratos e vinhos de variedades europeias *V. vinifera* L. No entanto, o aumento na produção de uvas americanas e do suco de uva, com sabor peculiar e propriedades nutricionais, levou à expansão do consumo deste derivado, contribuindo para o crescente interesse acerca de seu potencial econômico e, principalmente, das propriedades bioativas de seus constituintes fenólicos (MELLO, 2011; TOALDO et al., 2013).

Este trabalho apresenta como objetivos: avaliar a influência da adição de sementes de uva e de enzimas pectinolíticas no teor de compostos fenólicos, na atividade antioxidante *in vitro* e no teor de macro e microelementos de sucos de uva de diferentes variedades *V. labrusca* L.; avaliar o efeito do consumo agudo de sucos de uva tintos, orgânico e convencional, sobre a atividade antioxidante e peroxidação lipídica em indivíduos saudáveis; e determinar as propriedades bioativas



do *trans*-resveratrol, um dos mais importantes fenólicos bioativos da uva, sobre células intestinais e endoteliais humanas em cocultura, quanto a mecanismos oxidativos envolvidos na disfunção endotelial.

A presente tese é 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. No Capítulo 1, de revisão bibliográfica, são abordados os principais aspectos da viticultura nacional, com enfoque em uvas *V. labrusca* L. cultivadas na região Sul do Brasil e no seu principal produto, o suco de uva. A revisão contempla as etapas da produção tecnológica do suco de uva, a aplicação de enzimas e o cultivo de uvas orgânicas, bem como as principais características de variedades americanas e seus sucos, com ênfase nos compostos fenólicos. Dessa forma, são descritos a composição química da uva e dos sucos, sua composição elementar e seus constituintes fenólicos, seu potencial antioxidante e propriedades bioativas, em especial em relação a mecanismos associados às doenças cardiovasculares.

No Capítulo 2, foram investigados os efeitos da adição de sementes de uva, como um importante subproduto da produção tecnológica de sucos, sobre o conteúdo fenólico, atividade antioxidante *in vitro* e composição elementar de sucos de uva de diferentes variedades *V. labrusca* L., amplamente cultivadas na região Sul do Brasil.

O Capítulo 3 apresenta a influência da aplicação de enzimas e otimização da atividade pectinolítica, através de delineamento estatístico experimental, na extração de compostos fenólicos e na composição elementar, quanto à macro e microelementos, de sucos de uva *V. labrusca* L. produzidos em escala piloto.

Os Capítulos 4 e 5 compreendem a avaliação do potencial bioativo *in vivo* de sucos de uva *V. labrusca* L. a partir de um estudo de intervenção controlado e randomizado em indivíduos saudáveis. No estudo, foram avaliados os efeitos do consumo agudo de dois sucos de uva tintos industrializados, um orgânico e um convencional, sobre a atividade antioxidante, glicemia, concentração de ácido úrico e marcadores de peroxidação lipídica.

O Capítulo 6 é referente às atividades desenvolvidas no estágio de doutorado no exterior, realizado na Universidade de Gent, Gent, Bélgica, no período de agosto de 2014 a julho de 2015. Nesta etapa, foram avaliados os efeitos do *trans*-resveratrol, um importante fenólico

presente em uvas e sucos de uva *V. labrusca* L., quanto a mecanismos de comunicação celular entre células intestinais e endoteliais humanas através de modelo *in vitro* de cocultura, combinando os efeitos de absorção com a bioatividade em funções cardiovasculares.

## **CAPÍTULO 1**

### **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**



## 1. VITICULTURA E PRODUÇÃO DE SUCO DE UVA NO BRASIL

A cultura de videiras (*Vitis* sp.) é bastante difundida no Brasil, com destaque para o cultivo das espécies *V. vinifera* L., de origem euroasiática, e *Vitis labrusca* L., originária da América Setentrional (EPAGRI, 1999; JACKSON, 2008).

A viticultura brasileira teve início no século XVI com a chegada de colonizadores portugueses à Capitania de São Vicente, no atual Estado de São Paulo. Nas primeiras décadas do século XIX, foram introduzidas as primeiras variedades de uvas americanas *V. labrusca* L. procedentes da América do Norte. A variedade Isabel passou a ser plantada nas diversas regiões do país, tornando-se a base para o desenvolvimento da vitivinicultura comercial nos Estados do Rio Grande do Sul e de São Paulo (PROTAS; CAMARGO; MELLO, 2008).

A viticultura é desenvolvida tradicionalmente em diversas regiões brasileiras, tendo se adaptado às condições de clima temperado, subtropical e tropical. Na viticultura de clima temperado, destacam-se as regiões Sul e Sudeste, abrangendo as regiões Norte e Central do Rio Grande do Sul, as regiões do Vale do Rio do Peixe e Planalto Sul de Santa Catarina, a região Sul de Minas Gerais, e a região Sudeste do Estado de São Paulo. Mais de 90% da produção de uvas em clima temperado são destinados ao processamento e fabricação de sucos, vinhos, e outros derivados (PROTAS; CAMARGO, 2011; IBRAVIN, 2013).

As regiões de viticultura de clima tropical compreendem o Noroeste do Estado de São Paulo, Norte de Minas Gerais e Vale do Sub-Médio São Francisco nos Estados de Pernambuco e Bahia. A viticultura de clima subtropical é desenvolvida no Estado do Paraná, onde predominam o cultivo e a produção de uvas de mesa (IBRAVIN, 2013).

O cultivo de uvas no Brasil ocupa uma área de 82.530 hectares, com as maiores áreas de colheita, produção e rendimento médio situadas nas regiões Sul e Sudeste. O Estado do Rio Grande do Sul é o maior produtor, com 51.230 hectares de área plantada (IBGE, 2012).

A cadeia produtiva da uva tem grande relevância na economia, contribuindo para a sustentabilidade da agricultura familiar e industrial, e geração de empregos a partir de empreendimentos no território brasileiro (PROTAS; CAMARGO, 2011; MELLO, 2011).

No cenário nacional, em 2011, foram produzidas 1.463.481 toneladas de uvas destinadas ao consumo *in natura* e produção de derivados como vinhos, sucos, concentrados, geleias e doces. Devido às condições climáticas favoráveis, a produção de uvas destinadas ao processamento aumentou em quase 50% em relação ao ano anterior, representando 57,13% do total produzido no país (MELLO, 2011).

A região Sul concentra 75% do cultivo de uvas no país, representando a maior produtora nacional da fruta. Em 2012, foram produzidas 990.010 toneladas de uva na região, com rendimento médio de 16.171 kg/hectares, sendo o Estado do Rio Grande do Sul responsável pela maior parte da produção, totalizando 820.599 toneladas. Nesse mesmo ano, o Estado do Paraná produziu 104.800 toneladas da fruta em uma área de 6.000 hectares, e o Estado de Santa Catarina contribuiu com 6,1% da produção nacional, com 64.611 toneladas em uma área de 5.009 hectares (IBGE, 2012). Devido a condições climáticas desfavoráveis, o Rio Grande do Sul, maior Estado produtor, registrou uma redução na safra de 2014, com produção total de 606.080 toneladas de uva, sendo 540.080 toneladas correspondentes a uvas comuns de mesa, entre americanas e híbridas (UVIBRA, 2015b).

Com relação aos derivados, a produção de vinhos e sucos no Rio Grande do Sul, em 2012, foi de 579,31 milhões de litros, com aumento de 0,1% em relação ao ano anterior. Nesse período, o maior acréscimo ocorreu na produção de suco de uva concentrado, com aumento de 27,3% (MELLO, 2012).

Com a expansão da produção da fruta, a fabricação de suco de uva tem torna-se uma alternativa à produção de vinhos e um atrativo investimento para pequenos e médios produtores, promovendo o surgimento de pequenas agroindústrias e contribuindo para melhor distribuição de renda e estabilidade no setor vitícola (RIZZON; MANFROI; MENEGUZZO, 1998; IBRAVIN, 2013). A produção brasileira de suco de uva está concentrada no Rio Grande do Sul, mas observa-se uma forte tendência de expansão para regiões tropicais como Mato Grosso, Goiás e Vale do Sub-Médio São Francisco (CAMARGO; MAIA; RITSCHER, 2010; LIMA et al., 2014).

O plantio de uvas mais produtivas e resistentes, de fácil cultivo e com riscos reduzidos, garante uma atividade rentável aos viticultores e supre a demanda da indústria de suco e vinhos populares na região Sul do Brasil. As alternativas para este mercado compreendem tradicionalmente as variedades *V. labrusca* L. (CAMARGO, 2008; PROTAS; CAMARGO, 2011). O suco de uva brasileiro é elaborado principalmente com uvas americanas *V. labrusca* L. Entre as principais

variedades, destacam-se a Concord, Isabel, Bordô e Niágara (RIZZON; MENEGUZZO, 2007).

Suco de uva é a bebida não fermentada, obtida do mosto simples, sulfitado ou concentrado, de uva sã, fresca e madura. É extraído da uva através de processo tecnológico adequado, e submetido a tratamento que assegure sua conservação até o consumo (BRASIL, 1988; BRASIL, 2000). A legislação brasileira classifica o suco de uva em: integral, adoção, reprocessado ou reconstituído, desidratado e concentrado. No suco de uva integral, o açúcar provém exclusivamente da uva, sendo vedada sua adição na forma de sacarose. Suco de uva reprocessado ou reconstituído é aquele obtido através da diluição do mosto concentrado, e o suco concentrado é obtido através de desidratação parcial com teor final mínimo de sólidos solúveis de 65 °Brix (BRASIL, 2004). A Tabela 1 apresenta os parâmetros exigidos na legislação para o suco de uva integral.

Tabela 1. Limites analíticos estabelecidos para o suco de uva integral.

Parâmetros analíticos	Limite	
	Mínimo	Máximo
Densidade relativa a 20 °C, g cm <sup>-3</sup>	1,057	-
Sólidos solúveis, °Brix a 20 °C	14,0	20,0
Sólidos insolúveis, % v/v	-	5,0
Açúcares redutores (glicose, g/100 g)	-	20,0
Relação °Brix/acidez total	15,0	45,0
Acidez total, ácido tartárico g/100 g	0,90	-
Acidez volátil, ácido acético g/100 g	-	0,025
Álcool etílico, % v/v a 20 °C	-	0,50
Arsênio (mg/L)	-	0,20
Chumbo (mg/L)	-	0,30
Cobre (mg/L)	-	1,0
Estanho (mg/L)	-	250,0
Ferro (mg/L)	-	15,0
Zinco (mg/L)	-	5,0

Fonte: BRASIL (2004).

Com o intensivo cultivo de uvas americanas e a progressiva demanda de derivados, o mercado de suco de uva está em plena ascensão. Em 2010, foram produzidos e comercializados mais de 180

milhões de litros de suco de uva provenientes do Rio Grande do Sul, com crescimento superior a 24% em relação ao ano de 2007 (MELLO, 2012). Em 2011, o suco de uva integral apresentou aumento de 28,6% no volume total comercializado, e de 35,5% em relação a sua comercialização em 2009 (MELLO, 2011; IBRAVIN, 2013). Em relação ao ano de 2013, o suco de uva apresentou um incremento na produção de 10,85% em 2014, com 7% de aumento na produção do suco concentrado (MELLO, 2014). Além do consumo interno, a produção de suco de uva é favorável ao comércio internacional. Em 2011, foram exportadas 4.452 toneladas de suco de uva, enquanto que em 2012 as exportações do produto somaram 2.473 toneladas, gerando 7.719 milhões de dólares (MELLO, 2012).

## **2. PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DE VARIEDADES *V. LABRUSCA* L.**

Na Europa no século XIX, a enxertia com variedades americanas *V. labrusca* L. conferiu maior resistência a infecções e garantiu a sobrevivência de diversas variedades *V. vinifera* L. europeias (CHIRA et al., 2008). Devido à maior rusticidade das videiras da espécie *V. labrusca* L., os enxertos com suas variedades são bastante comuns na viticultura nacional (CAMARGO, 2008). Suas uvas são denominadas "uvas rústicas" ou "uvas de mesa" e apresentam elevada produtividade e resistência às doenças que acometem as cultivares *V. vinifera* L., como o míldio, principal doença fúngica da videira no Brasil. Assim, o cultivo de uvas americanas mais resistentes representa uma interessante alternativa para a produção de uvas, vinhos e sucos (PROTAS; CAMARGO, 2011).

No mercado nacional, as uvas comuns de mesa compreendem principalmente uvas americanas, como Niágara Rosada, Isabel e Niágara Branca, que são bastante apreciadas e respondem por 50 % do volume comercializado de uvas *in natura*, sendo grande parte da produção destinada à elaboração do suco de uva. Estas uvas são produzidas tradicionalmente na região Sul, nos meses de janeiro e fevereiro (CAMARGO; MAIA; RITSCHER, 2010).

As variedades *V. labrusca* L. de maior expressão e principalmente empregadas na elaboração do suco de uva compreendem a Isabel, Bordô, Concord, Niágara Branca e Niágara Rosada. Além destas, novas variedades também são utilizadas, como a BRS Rúbea, BRS Cora e a BRS Violeta, lançadas pela Embrapa Uva e Vinho, e



ainda os clones Isabel Precoce e Concord Clone 30 (RIZZON; MENEGUZZO, 2007; LIMA et al., 2014).

A região da Serra Gaúcha no Rio Grande do Sul é a maior produtora nacional de uvas americanas *V. labrusca* L., compreendendo também a maior região vitícola do país, com cerca de 40 mil hectares de vinhedos. A maior parte das uvas na região é destinada à elaboração de vinhos, sucos e outros derivados, como vinagre, doces e geleias (EMATER, 2012).

Na região da Serra Gaúcha, a viticultura é tradicionalmente de pequenas propriedades, com predomínio do uso da mão-de-obra familiar. Mais de 80% da produção da região se origina de variedades americanas (*V. labrusca* L. e *V. bourquina* L.) e híbridas (RIZZON; MENEGUZZO, 2007; IBRAVIN, 2013).

A Serra Gaúcha é a maior região produtora de suco de uva no país, principalmente elaborado a partir de uvas americanas *V. labrusca* L., que apresentam características de aroma, cor e sabor necessárias para a obtenção de um produto de elevada qualidade e tipicidade (EPAGRI, 1999; RIZZON; MENEGUZZO, 2007). Os sucos dessas variedades geralmente apresentam coloração púrpura-violácea, aroma marcante “foxado” característico de *V. labrusca* L., e excelente equilíbrio entre doçura e acidez (RIZZON; MANFROI; MENEGUZZO, 1998).

## 2.1. VARIEDADE BORDÔ

A variedade Bordô, originária dos Estados Unidos, é uma das principais uvas *V. labrusca* L. produzidas nacionalmente. Na década de 1850, a variedade despertou interesse dos viticultores europeus devido à resistência ao oídio, fitopatia causada por fungos, que na época causava enorme prejuízo à viticultura mundial (GRIGOLETTI; SÔNEGO, 1993). No Brasil, foi introduzida no Rio Grande do Sul em 1839, com o nome de Ives ou Folha de Figo, e sua expansão ocorreu rapidamente devido à sua 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 grande dificuldade de desenvolvimento em climas tropicais. Assim, sua recomendação de cultivo é restrita às regiões Sul de Minas Gerais e Norte do Paraná, além dos Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina. Seus cachos são

pequenos ou médios, com bagas pretas pequenas, polpa mucilaginosa e sementes pequenas (CAMARGO, 2008).

Uvas Bordô são principalmente destinadas à elaboração de sucos, vinhos, vinagres e geleias, e ao consumo *in natura* (RIZZON; MANFROI; MENEGUZZO, 1998). A variedade é bastante apreciada na atividade agroindustrial, pois permite aumentar a intensidade de cor de sucos e vinhos de cultivares com coloração deficiente. As uvas contêm teor de sólidos solúveis entre 13 e 16 °Brix e reduzida acidez total (RIZZON; MENEGUZZO, 2007).

Sucos de uva Bordô apresentam aroma frutado e alta concentração de pigmentos antocianícos, sendo geralmente empregados em cortes com sucos de outras variedades *V. labrusca* L. (BARNABÉ; VENTURINI; BOLINI, 2007).

## 2.2. VARIEDADE ISABEL

Originária dos Estados Unidos, a variedade Isabel foi introduzida no Brasil na década de 1830, tornando-se a principal variedade americana em área de parreirais do país. É a variedade mais cultivada no Rio Grande do Sul e em Santa Catarina, representando 50% do total de uvas produzidas, com menor expressão em regiões de climas tropicais, como São Paulo, Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso. Na região Sul, é muito bem adaptada às condições climáticas, seus vinhedos atingem de 80 a 100 anos e fornecem produções abundantes com limitado número de tratamentos fitossanitários (CAMARGO, 2008).

A variedade também é denominada Americana, Uva Manga e Nacional, além de Frutilla no Uruguai e Isabela ou Fragola na Itália (RIZZON; MANFROI; MENEGUZZO, 1998; NIXDORF; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, 2010). Suas características incluem cachos pequenos a médios, baga preta, média, polpa mucilaginosa, desprendendo-se facilmente da película, e sabor de framboesa agradável. Apresenta boa rusticidade e alta fertilidade (CAMARGO, 2008).

Uvas Isabel são destinadas ao consumo *in natura* e empregadas na elaboração de sucos, vinhos de mesa, geleias e doces. Origina sucos e vinhos com aroma “foxado”, pouco coloridos em anos chuvosos, mas bastante apreciados por consumidores. O suco Isabel é o principal suco de uva brasileiro para exportação (CAMARGO, 2008). Entre as uvas americanas, essa variedade apresenta baixa acidez e elevado teor de sólidos solúveis na baga, que pode variar entre 16 e 19 °Brix (RIZZON; MENEGUZZO, 2007).

A variedade Isabel, pela grande disponibilidade de matéria-prima, é responsável pelo maior volume de suco produzido no Brasil. No entanto, essa variedade produz sucos com menor intensidade aromática e de cor em relação a outras variedades americanas, como Bordô e Concord, sendo indicada a sua mistura ou “*blend*” com essas variedades na produção do suco de uva (FENOCCHIO, 1973; CAMARGO; MAIA; RITSCHER, 2010).

### 2.3. VARIEDADE CONCORD

A variedade Concord, também conhecida como Bergerac, Francesa e Francesa Preta, compreende uvas americanas rústicas, de alta produtividade e resistência a doenças fúngicas. Trata-se de uma variedade bastante difundida nos Estados Unidos, especialmente no estado de Nova York, onde foi desenvolvida no ano de 1849. No Brasil, a variedade foi introduzida no século XIX, no estado do Rio Grande do Sul, difundindo-se para Santa Catarina e Paraná, sendo principalmente destinada à produção de suco devido às suas características aromáticas (RIZZON; MANFROI; MENEGUZZO, 1998; PIAN et al., 2009).

Uvas Concord também são cultivadas para o consumo *in natura* e produção de vinhos de mesa. Apresentam maturação precoce, alta produtividade e resistência a infecções. Seus cachos são médios, com bagas médias e com película fina bastante susceptível ao rachamento em condições chuvosas na fase de maturação. O teor de sólidos solúveis varia de 14 a 16 °Brix e a acidez é relativamente baixa (RIZZON; MENEGUZZO, 2007).

O suco de uva Concord mantém as características da uva fresca ao longo das etapas de processamento, apresentando sabor e aroma agradáveis e boa relação açúcar/acidez (MARZAROTTO, 2005).

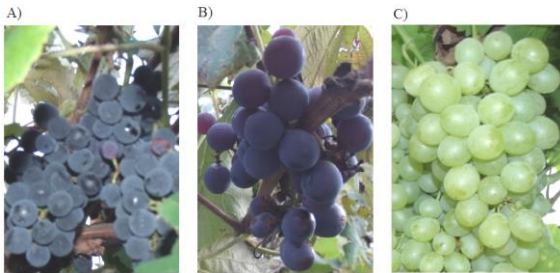
### 2.4. VARIEDADES NIÁGARA BRANCA E NIÁGARA ROSADA

A variedade Niágara Branca foi criada em 1868, no condado de Niágara, estado de Nova York, Estados Unidos, a partir do cruzamento de Concord (*V. labrusca* L.) com Cassady (*V. labrusca* L. x *V. vinifera* L.), compreendendo, em sua genealogia, 75% de *V. labrusca* L. e 25% de *V. vinifera* L., um provável fator para sua menor resistência a doenças fúngicas em comparação à Concord, uma *V. labrusca* L. pura (MAIA; CAMARGO, 2012).

As uvas Niágara Branca, também denominadas Francesa Branca, foram introduzidas no Brasil em 1894 e inicialmente cultivadas em localidades rurais próximas à cidade de São Paulo (CAMARGO, 2008). A variedade Niágara Rosada é resultado de mutação somática ocorrida na Niágara Branca, em 1933, em Louveira no estado de São Paulo, que rapidamente predominou sobre a variedade original. A Niágara Rosada tem se destacado como interessante alternativa em relação às variedades finas europeias na produção de uvas nas regiões tropicais do Brasil. Seu cultivo expandiu-se rapidamente nos estados de São Paulo, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Minas Gerais. Por ser menos suscetível às doenças fúngicas e apresentar menor custo de produção, possibilita melhor renda ao pequeno produtor (MAIA; CAMARGO, 2012).

As variedades Niágara Rosada e Niágara Branca apresentam polpa mucilaginoso, sabor de framboesa intenso e gosto doce, com teor de sólidos solúveis entre 16 e 18 °Brix (CAMARGO, 2008).

Figura 1. Principais variedades *V. labrusca* L. empregadas na elaboração de suco de uva na região Sul do Brasil. A) Bordô; B) Isabel; C) Niágara Branca.



Fonte: Acervo do autor.

### 3. CULTIVO DE UVAS ORGÂNICAS E SUCO DE UVA ORGÂNICO

Acompanhando as tendências mundiais, o consumidor brasileiro passou a valorizar alimentos produzidos em sistemas que estabeleçam compromissos com a preservação do meio-ambiente, da saúde e da estrutura de produção, que possibilitem interação consumidor/ produtor, com produto final que atenda aos requisitos de segurança alimentar (CAMARGO; TONIETTO; HOFFMANN, 2011).

Embora as variedades *V. labrusca* L. apresentem rusticidade no seu desenvolvimento no campo, problemas fitossanitários podem ser dependentes de condições climáticas do ano agrícola, motivando o emprego de fungicidas no controle de fitopatias. Em safras sucessivas, a resistência de fungos em relação aos tratamentos químicos contribui para o incremento no número de pulverizações e compostos químicos utilizados (GRIGOLETTI; SÔNEGO, 1993; CAMARGO; TONIETTO; HOFFMANN, 2011).

Em busca de alternativas quanto ao cultivo e produção de uvas, os produtores foram atraídos do sistema de cultivo convencional, em que se empregam herbicidas e pulverizações com fungicidas sintéticos, para um sistema tecnologicamente mais limpo, o sistema de cultivo orgânico, onde se reduzem o uso de insumos, o impacto ambiental e os riscos de intoxicações, com maior valorização comercial do produto final (ROMBALDI et al., 2004).

Considera-se sistema orgânico de produção agropecuária todo aquele em que se adotam técnicas específicas, mediante a otimização do uso dos recursos naturais e socioeconômicos disponíveis e o respeito à integridade cultural das comunidades rurais, tendo por objetivo a sustentabilidade econômica e ecológica, a maximização dos benefícios sociais, a minimização da dependência de energia não renovável, empregando, sempre que possível, métodos culturais, biológicos e mecânicos, em contraposição ao uso de materiais sintéticos, a eliminação do uso de organismos geneticamente modificados e radiações ionizantes, em qualquer fase do processo de produção, processamento, armazenamento, distribuição e comercialização, e a proteção do meio ambiente (BRASIL, 2003).

Na agricultura orgânica não é permitido o uso de substâncias que coloquem em risco a saúde humana e o meio ambiente. Não são utilizados fertilizantes sintéticos solúveis, agrotóxicos e transgênicos. Para ser considerado orgânico, o produto tem que ser produzido em um ambiente de produção orgânica, onde se utiliza como base do processo produtivo os princípios agroecológicos que contemplam o uso responsável do solo, da água, do ar e dos demais recursos naturais, respeitando as relações sociais e culturais (BRASIL, 2008).

A produção, o processamento e a comercialização de produtos orgânicos no Brasil são regidos pela Lei 10.831/03 e seus anexos, que abrange os produtos agrícolas não transformados, os produtos de origem animal e os alimentos transformados. A mesma define igualmente as

exigências mínimas requeridas para inspeção à qual cada produtor, processador ou cada comerciante de produtos orgânicos deve submeter-se e com as quais deve assumir compromisso. Para os produtos orgânicos serem comercializados, três possibilidades são estabelecidas pela Lei 10.831/03: a venda direta ao consumidor; o Sistema Participativo de Garantia (SPG); e a certificação auditada (ECOCERT, 2013).

Na venda direta de produtos orgânicos ao consumidor não é exigido certificação, sendo que os produtores devem estar organizados e registrados junto ao Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), responsável pelo controle direto do setor. No Sistema Participativo de Garantia (SPG), a certificação é com base no controle social. Os produtores devem estar organizados e uma entidade jurídica sob controle dos mesmos deve estar registrada junto ao Ministério da Agricultura. Essa entidade legalmente constituída é responsável pela emissão dos documentos de garantia da qualidade orgânica dos produtos, válidos para o mercado nacional. Já a certificação auditada é realizada por certificadora acreditada pelo INMETRO e credenciada junto ao Ministério da Agricultura. As certificadoras são responsáveis pela emissão dos certificados que garantem a qualidade orgânica dos produtos, válidos para os mercados nacional e internacionais com os quais o Brasil possua acordos de equivalência (BRASIL, 2008; ECOCERT, 2013).

No Brasil, a Instrução Normativa nº 46 de 2011 estabelece, através de seu Anexo VII, a lista de substâncias e práticas para manejo, controle de pragas e doenças nos vegetais e tratamentos pós-colheita nos sistemas orgânicos de produção. Substâncias como própolis, cal hidratada, extratos de insetos, bicarbonato de sódio e bentonita são de uso lícito na agricultura orgânica. Entretanto, a utilização de cobre nas formas de hidróxido, oxiclreto, sulfato, óxido e octanoato é proibida no tratamento pós-colheita. A aplicação de fungicidas contendo cobre, na quantidade máxima de 6 kg de cobre/ha/ano, bem como a utilização de enxofre, caldas bordalesa e sulfocálcica, sulfato de alumínio e terras diatomáceas, necessita da autorização de Organismos de Avaliação da Conformidade Orgânica (OAC) ou de Organizações de Controle Social (OCS).

Compreende Organismo de Avaliação da Conformidade Orgânica a instituição que avalia, verifica e atesta que produtos ou estabelecimentos produtores ou comerciais atendem ao disposto no regulamento da produção orgânica, podendo ser uma certificadora ou Organismo Participativo de Avaliação da Conformidade Orgânica

(OPAC). Este, por sua vez, é uma organização que assume a responsabilidade formal pelo conjunto de atividades desenvolvidas num Sistema Participativo de Garantia (BRASIL, 2011).

Entende-se por Organização de Controle Social um grupo, associação, cooperativa, consórcio com ou sem personalidade jurídica, previamente cadastrado no Ministério da Agricultura, a que está vinculado o agricultor familiar em venda direta, com processo organizado de geração de credibilidade a partir da interação de pessoas ou organizações, sustentado na participação, comprometimento, transparência e confiança, reconhecido pela sociedade (BRASIL, 2011).

Em relação a uvas e seus produtos orgânicos, a produção no Brasil ainda é pequena, com poucas informações de cultivo e produção devido à dificuldade de controle estatístico oficial, uma vez que grande parte da atividade provém da agricultura familiar, cuja comercialização ocorre em feiras, diretamente ao consumidor. Entretanto, com a implementação do selo oficial de avaliação da conformidade orgânica, o credenciamento de certificadoras e o cadastro de produtores orgânicos no Ministério da Agricultura, a produção e a comercialização de uva orgânica e seus derivados deverão crescer de forma organizada e com maior controle em todas as etapas (CAMARGO; TONIETTO; HOFFMANN, 2011).

De acordo com dados gerais do setor, o mercado de orgânicos apresenta uma taxa de crescimento de 20% ao ano no país. Com relação a uvas e derivados, as tecnologias de produção orgânica estão evoluindo, sendo crescente o número de certificações, com o valor dos produtos previsto de 20 a 50% acima do valor da uva convencional (EMATER, 2012).

O suco de uva orgânico é um dos principais produtos do setor, com grande potencial de mercado, atendendo a exigências de consumidores que buscam qualidade e benefícios à saúde (EMATER, 2012). Uma vez que o sistema orgânico não utiliza pesticidas no cultivo agrícola, os vegetais, mais susceptíveis a fitopatias, necessitam produzir maiores quantidades de metabólitos secundários como mecanismo de defesa, como os compostos fenólicos. Sucos de uva orgânicos demonstraram maiores concentrações de antocianinas, resveratrol e taninos, quando comparados a sucos de uva convencionais (DANI et al., 2007).

#### 4. PROCESSAMENTO DO SUCO DE UVA

O processo de elaboração do suco de uva exerce influência nas características da bebida, sendo um fator limitante para a qualidade do suco de uva. O sabor e aroma são fatores determinantes da qualidade do suco de uva, assim como a sua cor e limpidez. Por ser um produto natural, as características finais do suco mantêm estreita relação com a qualidade da uva. Assim, o processo de elaboração do suco torna-se de extrema importância, sendo tanto mais eficiente quanto maior for sua capacidade de extrair e preservar as propriedades inerentes à uva fresca (RIZZON; MENEGUZZO, 2007).

Na produção do suco de uva, tratamentos como tipo de extração, tempo de contato entre o suco e as partes sólidas da uva (casca e sementes), prensagem, tratamentos térmico e enzimático, adição de dióxido de enxofre e ácido tartárico, interferem na quantidade dos compostos naturais da uva no suco pronto (SHAHIDI; NACZK, 1995).

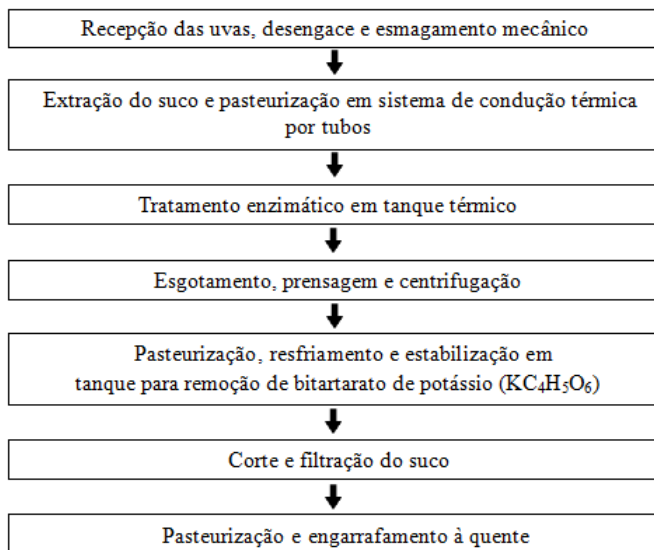
Um vigoroso esmagamento aumenta a extração e difusão de antocianinas e compostos fenólicos. Entretanto, resulta em sucos muito adstringentes e amargos. Além disso, a oxidação enzimática dos compostos fenólicos aumenta podendo levar ao escurecimento do suco. Manter as características aromáticas e gustativas durante o processamento e conservação é o principal desafio na produção tecnológica do suco de uva (RIZZON; MENEGUZZO, 2007).

Como processo tradicional, o processo Welch compreende a extração por aquecimento da uva de 60 a 90 °C, separação do suco, estabilização, engarrafamento ou armazenagem em tanques (MARZAROTTO, 2005).

O processamento industrial do suco de uva inclui as etapas de recepção da matéria-prima, remoção do engace (desengace) e esmagamento da uva, maceração e extração à quente, esgotamento e prensagem, clarificação (centrifugação, estabilização tartárica e filtração), pasteurização, engarrafamento e armazenamento (RIZZON; MANFROI; MENEGUZZO, 1998; MARZAROTTO, 2005). A Figura 2 ilustra as principais etapas do processamento do suco de uva.



Figura 2. Fluxograma das principais etapas de elaboração tecnológica de sucos de uva.



Fonte: Próprio autor.

Na etapa de recepção são avaliados o estado sanitário e a procedência das uvas conforme as características da variedade, sendo determinados o peso e o teor de açúcar na fruta com o auxílio de mostímetro de babo ou de refratômetro. É fundamental para a qualidade do suco que a uva madura tenha sido colhida recentemente, mantida ao abrigo do sol, apresente-se inteira e sem resíduos de produtos fitossanitários (MARZAROTTO, 2005).

Para a remoção do engace e esmagamento das uvas são utilizadas desengaçadeira e esmagadeira mecânica, geralmente em formato caracol, com leve esmagamento da uva, apenas com rompimento das bagas, sem a trituração das sementes (MARZAROTTO, 2005; RIZZON; MENEGUZZO, 2007).

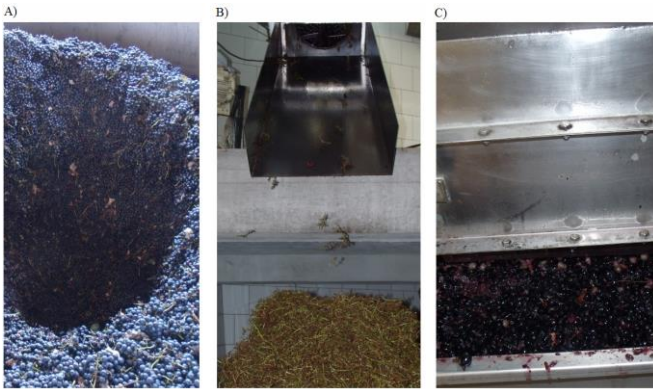
A maioria das variedades de uva utilizadas para elaboração do suco contém pigmentos antocianícos nas células internas da casca, e uma vez submetidas apenas ao esmagamento e prensagem, darão origem a sucos rosados. Assim, em sequência ao esmagamento, as uvas são

aquecidas, adicionadas de preparados enzimáticos e submetidas à maceração e extração à quente (SHAHIDI; NACZK, 1995; RIZZON; MANFROI; MENEGUZZO, 1998).

Na elaboração de sucos de uva brancos, o esmagamento é seguido de um período de maceração pelicular, onde a casca fica em contato com o suco para aumentar a extração de aromas. A extração pode ser facilitada e acelerada com adição de enzimas pectinolíticas. Os constituintes da uva macerados devem manter as características de frescor, de frutado, além da integridade da cor durante a extração do suco (RIZZON; MENEGUZZO, 2007).

As etapas iniciais do processamento do suco de uva são apresentadas na Figura 3.

Figura 3. Etapas da produção tecnológica do suco de uva. A) recepção das uvas; B) separação da ráquis; C) esmagamento das bagas em desengaçadeira-esmagadeira.

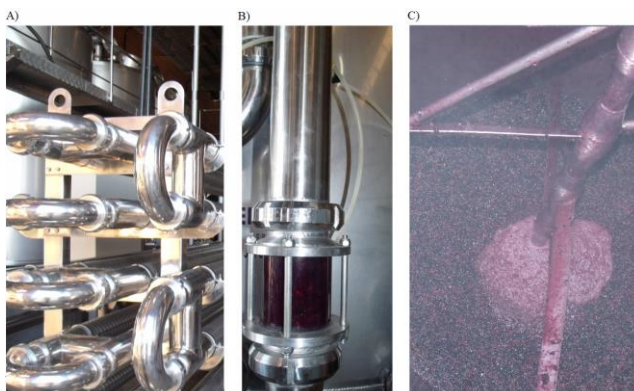


Fonte: Acervo do autor.

A maceração e a extração à quente têm como objetivo facilitar a extração e difusão de compostos naturais da uva, como os compostos fenólicos, presentes nas cascas, sementes e polpa, responsáveis pelas características sensoriais do suco. Nesta etapa, ocorre a maceração dos constituintes da uva e extração do suco em tanques térmicos de aço inoxidável, através de aquecimento indireto, geralmente sob agitação, empregando-se termomaceradores tubulares de abastecimento, formados por dois tubos concêntricos, em cuja parte externa circula água quente, e na interna, os constituintes da uva (VENTURIN, 2004).

As uvas esmagadas são enviadas aos tubos termomaceradores e tanques térmicos empregando-se bombas de pressão com vazão uniforme (Figura 4). O aquecimento deve alcançar no mínimo 65 °C para proporcionar uma adequada extração da cor. Contudo, a temperatura de aquecimento não pode ultrapassar 90 °C, de modo a prevenir a degradação de compostos fenólicos, bem como suprimir o sabor de cozido no suco de uva. Em seguida, ocorre a diminuição da temperatura no equipamento, de modo a favorecer o tratamento enzimático para degradação de pectinas, permanecendo a mistura no tanque por 1 a 2 horas (VENTURIN, 2004; RIZZON; MENEGUZZO, 2007).

Figura 4. Maceração e extração à quente do suco de uva. A) e B) aquecimento e passagem das uvas em termomaceradores tubulares; C) maceração das uvas sob agitação no interior de tanque térmico.



Fonte: Acervo do autor.

Após a extração do suco de uva, é necessária a separação dos constituintes sólidos do líquido, através dos processos de esgotamento e prensagem. Nestas etapas, deve-se evitar a excessiva dilaceração do bagaço, formado por cascas e sementes, de modo a reduzir o aparecimento de gostos herbáceos desagradáveis, e facilitar a operação de prensagem para otimizar a relação rendimento/qualidade (RIZZON; MENEGUZZO, 2007).

O processo de esgotamento é realizado em equipamento cilíndrico denominado esgotador dinâmico, e tem por finalidade

umentar a eficiência de separação do suco e as partes sólidas da uva. Consiste na separação do líquido na parte inferior, conduzindo a parte sólida à parte mais elevada, enviando-a diretamente para a prensa. O suco resultante da prensagem apresenta-se turvo em decorrência do processo de elaboração, contendo pequenas partes da película (casca) e sais de potássio em suspensão, com concentrações de sólidos insolúveis entre 4 e 8 % (RIZZON; MENEGUZZO, 2007).

As etapas de esgotamento e prensagem do suco de uva são ilustradas na Figura 5.

Figura 5. Etapas de esgotamento e prensagem na produção do suco de uva. A) separação de sólidos do suco em esgotador dinâmico; B) prensagem e remoção do bagaço (cascas e sementes).



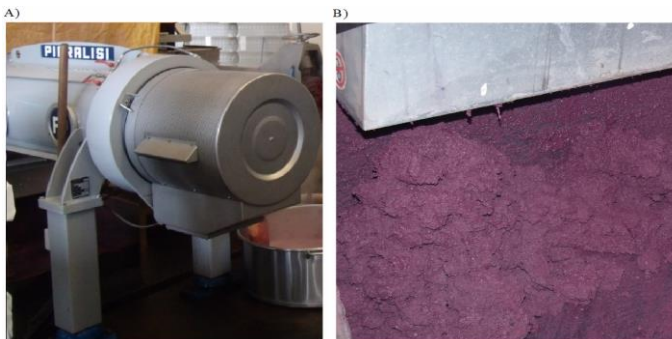
Fonte: Acervo do autor.

Geralmente, a turbidez e a presença de precipitações em sucos de uva são causadas por pectina, mucilagens, gomas, bitartarato de potássio e tartarato de cálcio. Em geral, essas precipitações são associadas a características naturais e de genuinidade do produto. No entanto, mesmo que muitas vezes aceitos por consumidores, esses sucos são prejudicados no aspecto visual, sendo necessário o processo de clarificação. O suco de uva pode ser submetido a diversos processos ou conjunto de processos para remoção de substâncias coloidais e decantação de compostos insolúveis (RIZZON; MANFROI; MENEGUZZO, 1998).

A clarificação age produzindo floculações que promovem a decantação das substâncias que causam turbidez no suco, podendo ser realizada através de centrifugação, filtração e/ou estabilização tartárica.

A centrifugação do suco é geralmente realizada à vácuo, em centrífuga decanter, de modo a aumentar a eficiência de separação de substâncias coloidais (RIZZON; MENEGUZZO, 2007). Nesta etapa é produzido o resíduo da centrifugação do suco de uva, principalmente destinado à adubação agrícola (Figura 6).

Figura 6. Etapa de clarificação do suco de uva através de centrifugação. A) centrífuga decanter à vácuo para remoção de substâncias coloidais no suco; B) remoção do resíduo da centrifugação do suco de uva.



Fonte: Acervo do autor.

A clarificação através de estabilização tartárica é geralmente necessária na produção do suco de uva, e consiste na separação dos sais tartáricos insolúveis, como bitartarato de potássio e tartarato de cálcio, através da precipitação em baixas temperaturas. O suco pronto é resfriado a temperaturas de 0 a 2 °C nos tanques, permanecendo nessas condições de 8 a 10 dias (RIZZON; MENEGUZZO, 2007).

Previamente à estabilização, é realizado o corte ou mistura dos sucos de variedades distintas, com o objetivo de atingir características de cor, aroma ou teor de sólidos solúveis desejados no suco de uva. Geralmente, devido a um remanescente de sólidos em suspensão, pode ser necessário o processo de filtração, que contribui para maior limpidez do suco (MARZAROTTO, 2005).

A conservação do suco de uva baseia-se na redução do contato do produto com o oxigênio atmosférico e inibição do crescimento de micro-organismos. A pasteurização é a principal técnica utilizada para sua conservação (RIZZON; MANFROI; MENEGUZZO, 1998;

VENTURIN, 2004). Tradicionalmente, os sucos de uva eram pasteurizados de 85 a 90 °C, temperaturas consideradas adequadas para inviabilizar os micro-organismos, mas que provocam perda de aromas pela degradação de compostos aromáticos. A utilização de temperaturas mais baixas associada à menor quantidade de oxigênio dissolvido na pasteurização permite obter sucos de uva mais aromáticos e com maior teor de compostos fenólicos e vitaminas. O calor favorece a estabilidade proteica e inativa as enzimas presentes na uva (RIZZON; MENEGUZZO, 2007).

Uma pasteurização adequada exige o controle preciso do tempo e da temperatura do processo, que deve ser aplicada com precisão de  $\pm 1,0$  °C e suportada pelo suco de uva de modo a preservar suas características (RIZZON; MANFROI; MENEGUZZO, 1998). Para o engarrafamento do suco de uva são indicadas temperaturas entre 65 e 68 °C, devendo o suco ser enviado diretamente às garrafas pré-aquecidas. O processo de pasteurização do suco necessita de um trocador de calor tubular ou de placas, e o suco deve estar previamente estabilizado e clarificado (RIZZON; MENEGUZZO, 2007).

Embora de maior custo, uma alternativa à pasteurização do suco de uva é o tratamento UHT (do inglês, *ultra high temperature*), que consiste no aquecimento do suco a temperaturas elevadas durante segundos, seguindo-se imediata redução à temperatura ambiente e armazenamento em recipientes esterilizados. Em sucos de uva emprega-se, geralmente, a temperatura de 95 °C por 2 segundos (RIZZON; MENEGUZZO, 2007).

As indústrias vinícolas brasileiras geram anualmente cerca de 59 milhões de quilos de subprodutos destinados principalmente à compostagem agrícola. Estudos demonstraram que resíduos industriais de uva, como cascas e sementes, são atraentes fontes de polifenóis como antioxidantes naturais (MOURE et al., 2001; VOLF; POPA, 2004; ROCKENBACH et al., 2011b; GIBIS; WEISS, 2012).

Subprodutos da viticultura podem conter quantidades elevadas de polifenóis, em concentrações superiores às encontradas em porções comestíveis da fruta. A utilização destes resíduos como matérias-primas valiosas pode significar um ganho econômico significativo e a diminuição dos problemas ambientais associados à acumulação de subprodutos das uvas (ROCKENBACH et al., 2011a).

#### 4.1. ENZIMAS PECTINOLÍTICAS NA ELABORAÇÃO DO SUCO DE UVA

Em indústrias vitícolas, o tratamento enzimático é empregado a fim de aumentar a extração de compostos e o rendimento durante a elaboração de derivados, como o suco e vinhos. As pectinases são tradicionalmente utilizadas no tratamento preliminar da uva para produção do suco (RIZZON; MANFROI; MENEGUZZO, 1998; JACKSON, 2008).

No processamento do suco, substâncias pécticas presentes na uva são extraídas durante o esmagamento e prensagem dos frutos. A extração é favorecida com o aquecimento, favorecendo também a liberação de compostos fenólicos, como as antocianinas, que conferem coloração ao suco (JACKSON, 2008).

Na etapa de prensagem, a pectina pode causar entupimento e reduzir a eficiência do processo, prejudicando também a filtração do suco, notadamente, de variedades *V. labrusca* L. A adição de enzimas pectinolíticas reduz consideravelmente o teor de pectina e seu efeito nas etapas de prensagem e filtração, contribuindo para a extração do suco e rendimento do processo. Além disso, a utilização dessas enzimas permite a redução dos resíduos vegetais proveniente do processamento de sucos (UENOJO; PASTORE, 2007; PARKIN, 2010).

As enzimas pectinolíticas, ou pectinases, são responsáveis pela modificação de substâncias pécticas em vegetais durante o amadurecimento. Estas enzimas degradam as substâncias pécticas através da hidrólise de ligações glicosídicas  $\alpha$ -(1,4) ao longo da cadeia de carbono (WHITAKER, 1996). São extraídas de plantas e micro-organismos, notadamente de fungos do gênero *Aspergillus*, tendo como principais aplicações comerciais a maceração e extração de tecidos vegetais e a clarificação de sucos (KASHYAP et al., 2001; ALIMARDANI-THEUIL; GAINVORS-CLAISSE; DUCHIRON, 2011).

Enzimas pectinolíticas são classificadas segundo a Comissão de Enzimas (EC) (do inglês, *Enzyme Commission*) de acordo com a preferência pelo substrato (pectina, ácido péctico ou protopectina), ação na estrutura galacturônica (transeliminação ou hidrólise) e mecanismo de clivagem (randômica ou terminal). As três principais pectinases compreendem a pectina esterase, as despolicimerizantes (hidrolases e

liases) e as protopectinases (WHITAKER, 1996; KASHYAP et al., 2001).

A pectina esterase (polimetilgalacturonato esterase, PMGE) apresenta atividade desesterificante e atua removendo grupos metil éster da cadeia galacturônica, liberando metanol e convertendo pectina em pectato. Esta enzima, presente em praticamente todas as preparações enzimáticas comerciais, apresenta valores de pH ótimo entre 4 e 8 e temperatura ótima de 40 a 50 °C. As pectinases despolimerizantes atuam através da clivagem hidrolítica ou transeliminativa das ligações glicosídicas  $\alpha$ -(1,4), apresentando alta atividade enzimática em pH ótimo entre 4 e 5 e temperatura ótima entre 30 e 50 °C. Neste grupo incluem-se as hidrolases, polimetilgalacturonases (PMG) e poligalacturonases (PG), e as liases, pectina liase (polimetilgalacturonato liase, PMGL) e pectato liase (poligalacturonato liase, PGL). As protopectinases solubilizam a protopectina, formando pectina solúvel altamente polimerizada. Protopectinases não são muito abundantes e possuem pouco interesse industrial na degradação da pectina (WHITAKER, 1996; KASHYAP et al., 2001; UENOJO; PASTORE, 2007).

Na elaboração do suco de uva, o tratamento enzimático é realizado logo após a etapa de tratamento térmico e maceração, utilizando preparações comerciais de pectinases, geralmente constituídas por uma mistura de enzimas que atuam na degradação da pectina, celulase e hemicelulase (JACKSON, 2008; PARKIN, 2010). A partir da hidrólise enzimática das paredes celulares, ocorre aumento na extração de compostos fenólicos, aumento do rendimento do suco, diminuição no conteúdo de açúcares, matéria seca, e acidez titulável, com consequente redução de resíduos, e diminuição da viscosidade, facilitando a filtração do produto final. Além disso, o tratamento enzimático geralmente não acarreta aumento nos custos de produção (PAIVA; LIMA; PAIXÃO, 2009; BROWNLEADRES et al., 1999).

A dosagem de enzimas pectinolíticas empregada é variável conforme o teor de pectinas da uva, acidez e temperatura do mosto. Na produção do suco, geralmente são utilizadas pectinases comerciais em concentrações de 2 a 4 g/100 L de mosto. A aplicação é realizada através da diluição das enzimas em água e homogeneização durante o aquecimento do mosto (RIZZON; MENEGUZZO, 2007). Os sucos obtidos com a utilização de enzimas pectinolíticas não apresentam alterações de aroma e sabor, mas geralmente apresentam maior intensidade de cor e são considerados de qualidade superior (RIZZON; MANFROI; MENEGUZZO, 1998).



## 5. COMPOSIÇÃO DA UVA E DO SUCO DE UVA

A uva é constituída por casca, polpa e sementes. A casca representa entre 7 e 15% do peso total da uva, e atua como uma barreira hidrofóbica contra danos mecânicos, desidratação, infecções e radiação. Além da água, a polpa é composta por açúcares (10-30%), polissacarídeos (0,3-0,5%), ácidos orgânicos (0,9-2,7%), compostos nitrogenados (0,4-0,7%), minerais (0,08-0,28%), compostos fenólicos (0,05%) e compostos aromáticos (<0,01%), compreendendo cerca de 80% do peso da uva. A semente, com cerca de 6% do peso, é constituída por carboidratos (34-36%), compostos nitrogenados (4-6,5%), minerais (2-4%), lipídios (13-20%) e compostos fenólicos (4-10%), que correspondem a aproximadamente 60% dos compostos fenólicos da uva (PRIEUR et al., 1994; JACKSON, 2008).

Os compostos fenólicos predominantes nas sementes são os flavanóis: catequina, epicatequina, e seus polímeros de procianidinas (PRIEUR et al., 1994; JACKSON, 2008; GRIS, 2010).

O suco de uva fresco apresenta por litro 650 a 850 g de água, 150 a 250 g de açúcares, 6 a 14 g de ácidos orgânicos, 2,5 a 3,5 g de minerais, 1,0 a 1,5 g de vitaminas, 0,2 a 2,4 g de compostos fenólicos e 0,5 a 1g de compostos nitrogenados (RIZZON; MENEGUZZO, 2007). O suco de uva é uma bebida de gostos doce e ácido, com baixo teor de lipídios, proteínas e cloreto de sódio, sendo todos os seus constituintes facilmente assimiláveis pelo organismo humano (RIZZON; MANFROI; MENEGUZZO, 1998; JACKSON, 2008).

Com relação às vitaminas, o suco de uva contém baixas concentrações de vitaminas do complexo B (tiamina, riboflavina e niacina), ácido ascórbico e inositol, importantes nos processos de manutenção de resistência física, metabolismo dos açúcares e controle de radicais livres (RIZZON; MENEGUZZO, 2007). A concentração de vitaminas tende a diminuir com o processamento. A vitamina C é oxidada rapidamente após o esmagamento das uvas, a tiamina é degradada por ação de sulfitos ou exposição ao calor, e a riboflavina é oxidada devido à exposição à luz (JACKSON, 2008). Quanto ao conteúdo, 100 g de suco de uva contém, geralmente, 40 a 50 mg de inositol, 10 a 50 mg de ácido ascórbico, 50 a 60 mg de tiamina, 50 a 60 mg de riboflavina e 0,4 a 0,6 mg de niacina (RIZZON; MANFROI; MENEGUZZO, 1998). A concentração de vitamina C em sucos de uva *V. labrusca* L. é bastante variável, sendo relatados valores entre 3,7 e 25

mg em 100 mL de suco (PERKINS-VEAZIE; COLLINS, 2001; SANTANA et al., 2008).

### 5.1. AÇÚCARES E COMPOSTOS NITROGENADOS

Nas uvas, os principais açúcares são a glicose e frutose. Açúcares simples podem se ligar formando polímeros como pectinas, gomas, amido, hemicelulose e celulose, ou ligarem-se a moléculas de metabólitos secundários, como lactonas e antocianinas, para formar glicosídeos. A glicosilação aumenta a solubilidade, melhorando a extração desses compostos no suco de uva (JACKSON, 2008).

A concentração de açúcares na uva e no suco depende da espécie, variedade, maturidade e sanidade do fruto. Variedades *V. labrusca* L. atingem, geralmente, o conteúdo de sólidos solúveis entre 14 e 19 °Brix. Os principais açúcares no suco de uva são a glicose e frutose, que geralmente ocorrem em proporções semelhantes. Em sucos elaborados com uvas em estágio de maturação avançado encontra-se maior proporção de frutose. A sacarose também pode estar presente no suco de uva, porém em baixas concentrações (RIZZON; MENEGUZZO, 2007).

Os açúcares contribuem para a tipicidade e qualidade sensorial do suco de uva. Para a elaboração do suco, as uvas devem apresentar equilíbrio entre sólidos solúveis e acidez, e alto teor de matéria corante. Os açúcares, como sólidos solúveis predominantes em derivados da uva, estão relacionados ao aumento da volatilidade de compostos aromáticos no suco e em vinhos. Todavia, a relevância de açúcares quanto ao aroma desses produtos ainda não é bem estabelecida (JACKSON, 2008).

Devido a características varietais específicas, geralmente utiliza-se uma mistura ou “blend” de variedades como alternativa para atingir o equilíbrio entre sólidos solúveis e acidez, bem como a coloração desejada no suco de uva. A variedade Bordô, de intenso aroma frutado e alto conteúdo de pigmentos, é principalmente empregada na mistura com a variedade Isabel, que apresenta deficiência em cor e sabor (BARNABÉ; VENTURINI; BOLINI, 2007).

A uva e o suco contêm substâncias nitrogenadas na forma de polipeptídeos, proteínas, e aminoácidos. A presença de compostos orgânicos nitrogenados, como aminas e aminoácidos na uva, facilita a degradação de açúcares durante o processamento térmico do suco, levando à formação de sabor e aroma de caramelo, com geração de leve coloração dourada. Todavia, embora alguns aminoácidos apresentem gosto amargo ou doce, suas concentrações minoritárias no suco não

exercem considerável influência sensorial (JACKSON, 2008). A natureza dos subprodutos de degradação depende dos açúcares presentes no meio, das condições de pH e temperatura, e da natureza dos compostos nitrogenados (RIZZI, 1997).

## 5.2. ÁCIDOS ORGÂNICOS

O perfil e a concentração de ácidos orgânicos são importantes parâmetros de qualidade de uvas, do suco e vinhos durante o processamento e no produto final. Nas uvas, os ácidos orgânicos predominantes são o málico e o tartárico, sendo que o succínico e o cítrico estão em menor concentração. Os conteúdos de ácido tartárico e málico são importantes parâmetros durante o período de maturação da uva, sendo amplamente utilizada a razão ácido tartárico/ácido málico como um indicativo do grau de maturação da uva para definição da colheita (RIZZON; SGANZERLA, 2007; BURIN, 2010).

No suco de uva, os ácidos orgânicos são aqueles provenientes da uva, como os ácidos tartárico, málico e cítrico. Os ácidos orgânicos em sucos e vinhos influenciam não somente o equilíbrio entre aroma e cor, mas também a estabilidade química e o pH do meio, refletindo na qualidade final dos derivados (ROMERO; MUÑOZ, 1993; RIZZON; MENEGUZZO, 2007).

Na elaboração de sucos e vinhos, a liberação de ácidos a partir dos vacúolos das células em esmagamento permite a hidrólise ácida de compostos não-voláteis da uva, dando origem a compostos aromáticos como monoterpenos, C13-norisoprenóides, fenóis e ésteres. Além disso, o pH baixo é fundamental para a estabilidade da cor de sucos e vinhos, uma vez que com o aumento do pH as antocianinas perdem sua coloração vermelha, originando a coloração azul (SINGLETON, 1987).

Os ácidos orgânicos afetam a ionização dos compostos fenólicos, sendo o estado ionizado mais facilmente oxidado do que sua forma não ionizada, podendo ocorrer alterações na coloração dos derivados da uva. Também estão envolvidos na precipitação de pectinas e proteínas, que podem causar turbidez em sucos e vinhos (SINGLETON, 1987; JACKSON, 2008). Responsáveis pelo sabor ácido do suco de uva, os ácidos orgânicos apresentam poder bactericida pronunciado e exercem ação estimulante da secreção salivar e do suco gástrico (RIZZON; MENEGUZZO, 2007). Produzem sabor refrescante e modificam a percepção e as sensações causadas por outros sabores e

gostos, por exemplo, a redução da percepção de doçura (JACKSON, 2008).

### 5.3. MINERAIS

Diferentes elementos essenciais à saúde são encontrados nas uvas e derivados, como o suco e vinho (MORGANO; QUEIROZ; FERREIRA, 1999; RIZZON; LINK, 2006; TORMEN et al., 2011; ARCARI et al., 2013).

Os elementos são absorvidos do solo através do sistema radicular da videira e encontram-se nas cascas, sementes e polpa da uva. A composição e a concentração de minerais na uva refletem as características de absorção e transpiração da videira, sendo influenciadas pela espécie e variedade de uva, região de cultivo e solo, adubação, tratamentos fitossanitários e condições climáticas (JACKSON, 2008).

Os teores e a composição de minerais no suco de uva podem ser afetados durante o processamento, através de práticas que favoreçam a extração de compostos da uva ou pelo contato com materiais e equipamentos nas fases de elaboração, conservação, estabilização ou engarrafamento do suco (RIZZON; MENEGUZZO, 2007).

A maceração prolongada contribui para aumentar o teor de minerais no suco, enquanto que a estabilização reduz a concentração dos minerais cálcio e potássio (RIZZON; MANFROI; MENEGUZZO, 1998; RIZZON, 2005; GRINDLAY et al., 2008). O armazenamento em tanques de cimento pode elevar os níveis de cálcio no suco de uva, enquanto que o contato com equipamentos com corrosão aumenta os níveis de metais, como ferro e cobre. Altos teores de alumínio podem ser originados pelo uso de bentonita em processos vitícolas de filtração e clarificação (McKINNON; CATTRALL; SCHOLLARY, 1992; JACKSON, 2008).

O suco de uva contém de 1,5 a 3,0 gramas por litro de minerais, contribuindo para o suprimento de minerais essenciais ao organismo, como cálcio (Ca), fósforo (P), sódio (Na), magnésio (Mg), manganês (Mn), ferro (Fe), potássio (K), cromo (Cr), cobre (Cu), cobalto (Co), selênio (Se) e zinco (Zn). Uma vez absorvidos pela videira na forma de sais, os minerais K, Ca, Mg, Na, Mn, Na e Fe constituem os principais cátions no suco de uva, enquanto que fosfatos, cloretos e sulfatos constituem os principais ânions (RIZZON; MANFROI; MENEGUZZO, 1998).

Os principais minerais em sucos de uva *V. labrusca* L. compreendem os elementos K, Ca, Mg, Na e P, em maiores

concentrações, e os elementos Fe, Co, Cu, Zn e Mn, como micronutrientes (RIZZON; LINK, 2006). Em comparação a sucos de frutas tropicais, como abacaxi, acerola, caju, goiaba, manga e maracujá, o suco de uva contém maior conteúdo de minerais (MORGANO; QUEIROZ; FERREIRA, 1999).

Os minerais atuam fisiologicamente como nutrientes reguladores, participando em diversas vias metabólicas como cofatores enzimáticos, além de fazerem parte da constituição dos ossos, sangue e nervos. No organismo, os minerais neutralizam a ação de ácidos, como o ácido úrico, regulam o equilíbrio ácido-base, a pressão osmótica, as atividades musculares e nervosas, e facilitam a transferência de compostos essenciais através das membranas celulares (SHILS; OLSON; SHIKE, 1994). O consumo do suco de uva contribui para o suprimento das necessidades diárias de potássio. Além disso, o elevado teor de potássio e o baixo conteúdo de sódio encontrado no suco de uva compreendem um importante fator nutricional, uma vez que não favorecem a hipertensão arterial (RIZZON; MANFROI; MENEGUZZO, 1998).

Em elevadas concentrações, alguns elementos como cobre, ferro, cálcio, manganês e zinco podem ter efeitos prejudiciais sobre a estabilidade de vinhos e do suco de uva, originando fenômenos depreciativos da qualidade, como turbidez, precipitações e oxidações. Metais como o ferro e cobre são catalisadores de reações oxidativas, podendo causar alterações de sabor e turbidez no produto. Íons cobre podem associar-se lentamente a proteínas solúveis no suco ou vinho e causar turbidez. Elevados níveis de fosfato e ferro dão origem a um derivado férrico causador de turvação nesses produtos. Similarmente, o ferro pode reagir com o ácido tânico, dando origem a uma turvação férrica azul. Por outro lado, elevados níveis de cálcio podem retardar a precipitação de tartarato e aumentar a formação de cristais nos produtos engarrafados (JACKSON, 2008).

Além disso, metais e semimetais como chumbo (Pb), alumínio (Al), mercúrio (Hg), cádmio (Cd), estanho (Sn), arsênio (As) e selênio (Se) são potencialmente tóxicos, podendo causar sintomas agudos ou crônicos nos rins, fígado, coração, sistema vascular e imunológico (CAMPOS et al., 2010). A legislação brasileira estabelece limites máximos para os elementos arsênio, chumbo, cobre, estanho, ferro e zinco, em vinhos e derivados da uva, como o suco de uva (BRASIL, 2004).

Diversas técnicas analíticas são empregadas para a análise elementar de uvas e derivados, como as técnicas de espectrometria de absorção atômica com atomização por chama (FAAS), espectrometria de absorção atômica com atomização em forno de grafite (GFAAS), espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), e eletroforese capilar (SANTALAD et al., 2007; ARCARI, 2010; TORMEN et al., 2011). A técnica de ICP-MS destaca-se devido a sua alta sensibilidade, capacidade multielementar, possibilidade de medir razões isotópicas e determinar quase todos os elementos estáveis, em concentrações na ordem de  $\text{pg g}^{-1}$  a  $\text{g g}^{-1}$  (TORMEN et al., 2011).

Um espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado é constituído de sistema de introdução de amostras, fonte de ionização, sistema de focalização, analisador de massa e sistema de detecção de íons (ULRICH, 2001). O plasma consiste no estado de energia de um gás no qual praticamente todos os átomos e moléculas estão ionizados e é iniciado através de uma descarga em um gás inerte, usualmente argônio, que é semeado com elétrons livres oriundos de uma faísca de alta tensão, sendo sua sustentação alcançada por meio de campo eletro-magnético flutuante, produzido por gerador de onda de rádio frequência. Sua temperatura pode exceder 10000 K, sendo que em seu canal central a temperatura varia de 5000 a 7000 K. Um sistema de introdução de amostras apropriado é utilizado, com a função de converter a amostra em um aerossol que é, então, carregado ao plasma, onde ocorrem processos de dessolvatação, volatilização, dissociação e ionização. Após a ionização, o feixe de íons formado é extraído por diferença de pressão, sendo direcionado para a região de focalização. O feixe é acelerado e arremessado em um campo magnético onde os íons são separados de acordo com a razão massa/carga ( $m/z$ ). O feixe chega ao sistema analisador dotado de um detector simultâneo (ULRICH, 2001; GOIS, 2012).

Diversos estudos inferem a composição elementar como importante critério na investigação da origem e qualidade de sucos de uva, uma vez que a presença e a concentração de diferentes elementos podem gerar informações quanto ao tratamento da uva e processamento do suco, como ocorrência de contaminações e a adição de conservantes. De acordo com Ferreira et al. (2002), o teor de sódio é fator discriminante entre sucos e refrigerantes de uva, uma vez que refrigerantes apresentam maiores teores do mineral devido à adição do conservante benzoato de sódio. Em relação ao suco de uva tinto, maiores concentrações de enxofre podem ser encontradas no suco branco, devido à adição de conservantes à base de enxofre, como bissulfitos, para

prevenir a oxidação de compostos fenólicos e o escurecimento do produto. Em sucos elaborados com água mineral podem ser determinadas maiores concentrações dos minerais Mg, Ca, K e P (FERREIRA et al., 2002).

#### 5.4. COMPOSTOS FENÓLICOS

Entre frutas e vegetais, as uvas são consideradas principais fontes de compostos fenólicos. Estes apresentam atividades biológicas benéficas à saúde, compreendendo os compostos bioativos do suco de uva e do vinho (FAN; LOU, 2004; CHIRA et al., 2008).

Os compostos fenólicos encontram-se nas cascas, polpa e sementes da uva. Os principais compostos fenólicos presentes no suco de uva compreendem as antocianinas, flavonóis, flavanóis e os compostos não-flavonóides, como os ácidos fenólicos e o resveratrol (JACKSON, 2008). Entre os constituintes de uvas *V. labrusca* L., as sementes, geralmente, apresentam maiores concentrações de polifenóis (SANTOS et al., 2011).

A quantidade e a composição fenólica na uva e no suco dependem da variedade, das condições climáticas, do solo, do estágio de maturação da uva, das práticas de cultivo e das etapas e condições de processamento (SHAHIDI; NACZK, 1995; DELOIRE et al., 1998; MALACRIDA; MOTTA, 2005; ROMERO-CASCALES et al., 2012).

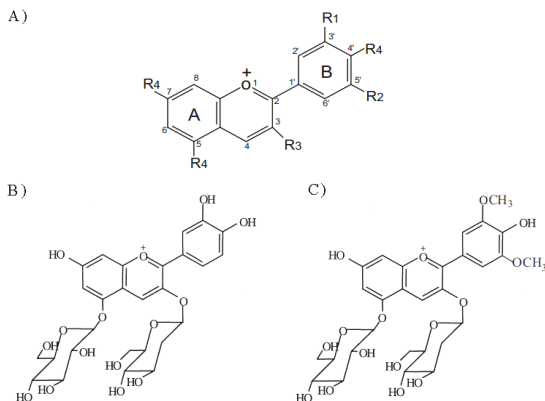
##### 5.4.1. COMPOSTOS FLAVONÓIDES

Os flavonóides apresentam estrutura comum (C6-C3-C6), que consiste em dois anéis aromáticos ligados por um anel pirano. Podem ocorrer na forma livre, glicosilada ou acilada. Os flavonóides presentes em uvas e no suco são as antocianinas, flavanóis e flavonóis, diferenciados pelo grau de insaturação e oxidação no anel pirano (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

##### *Antocianinas*

São compostos polihidroxi e polimetoxi derivados do cátion *flavílium* e glicosídeos de antocianidinas (Figura 7) (MAZZA; MINIATI, 1993).

Figura 7. Estrutura do cátion flavílium (A) e antocianinas majoritárias em uvas *V. labrusca* L.; B) cianidina-3,5-diglicosídeo; C) malvidina-3,5-diglicosídeo.



Adaptado de: Mazza e Miniati (1993); Chira et al. (2008).

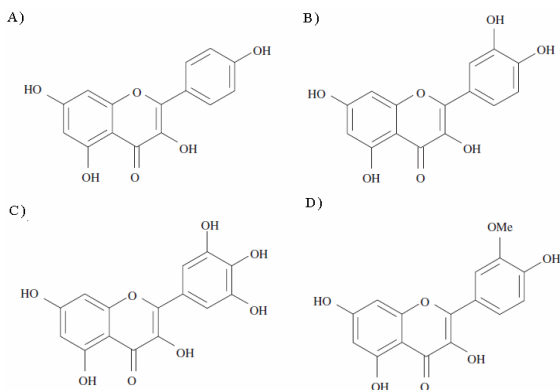
As antocianinas são pigmentos da classe dos flavonóides, responsáveis pela enorme diversidade de cores de flores e frutos. Antocianinas diferem do restante do grupo dos flavonóides por absorverem fortemente na região visível do espectro e pela capacidade de formar estruturas ressonantes através da variação do pH (MAZZA; MINIATI, 1993). Nas uvas, as principais antocianinas monoméricas são a malvidina, cianidina, deofinidina, petunidina, peonidina e perlagonidina. Em uvas *V. labrusca* L. e seus derivados, as antocianinas predominantes são encontradas em suas formas 3-5-*O*-diglicosídeo (Figura 7) (CHIRA et al., 2008; NIXDORF; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, 2010).

### Flavonóis

Os flavonóis são compostos oriundos da biossíntese dos flavonóides, caracterizados pela presença de uma insaturação no anel heterocíclico e um grupamento hidroxila na posição 3 (JACKSON, 2008). Nas uvas, compreendem principalmente a quercetina, miricetina, campferol e isorhamnetina (Figura 8) (MAKRIS; KALLITHRAKA; KEFALAS, 2006).



Figura 8. Estrutura aglicona dos principais flavonóis em uvas e derivados *V. labrusca* L. A) campferol; B) quercetina; C) miricetina; D) isorhamnetina.



Adaptado de: Makris, Kallithraka e Kefalas (2006).

Os flavonóis em uvas podem ser encontrados nas formas livre ou conjugada. Seus conjugados predominantes são os 3-*O*-glicosídeos (MAKRIS; KALLITHRAKA; KEFALAS, 2006).

Em sucos e vinhos *V. labrusca* L. encontram-se os flavonóis miricetina, quercetina campferol, isorhamnetina, e a rutina, derivado da quercetina, com predomínio das formas agliconas (NIXDORF; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, 2010; ROCKENBACH et al., 2011b; NATIVIDADE et al., 2013).

### Flavanóis

Os flavanóis presentes nas uvas compreendem os flavan-3-óis e as proantocianidinas, também denominadas taninos condensados. São constituídos por um núcleo flavânico formado por dois anéis aromáticos e um anel heterocíclico pirânico ao qual é ligado um grupamento hidroxil na posição 3 (PRIEUR et al., 1994).

Os flavanóis são extraídos das cascas e sementes da uva durante o processamento e podem sofrer transformações estruturais através de reações de oxidação e condensação. Em uvas, os flavan-3-óis encontram-se, principalmente, na forma livre representados por (+)-

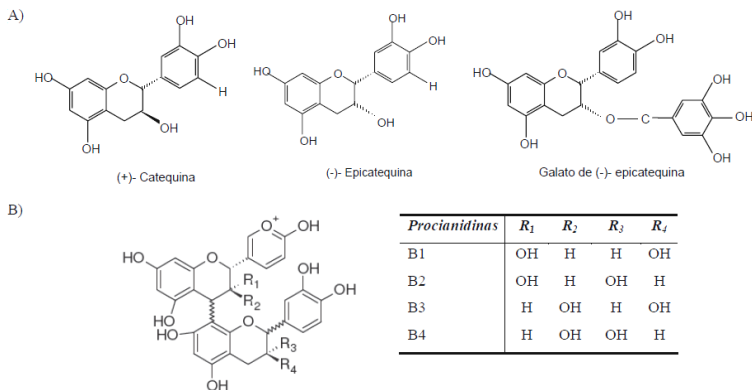
catequina, (-)-epicatequina, e galocatequinas (Figura 9A) (PRIEUR et al., 1994; JACKSON, 2008).

A catequina em sua forma monomérica é o principal flavan-3-ol encontrado em uvas *V. labrusca* L. (NIXDORF; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, 2010; ROCKENBACH et al., 2011b; NATIVIDADE et al., 2013).

As proantocianidinas ou taninos condensados são oligômeros e polímeros de catequina e epicatequina. Apresentam diversas propriedades devido à diversidade de suas estruturas, que provêm dos numerosos grupos hidroxila, da posição sobre o núcleo aromático, e da estereoquímica dos carbonos assimétricos do ciclo pirano (Figura 9B) (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

Os taninos encontram-se basicamente nas sementes e no engaço e tem efeito sobre o sabor de sucos e vinhos. Os taninos influenciam a qualidade da cor e seu grau de condensação relaciona-se à qualidade gustativa e à adstringência. Além disto, apresentam importantes propriedades farmacológicas como as atividades antioxidante, anti-inflamatória e anticarcinogênica (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006; JACKSON, 2008).

Figura 9. Estrutura dos flavanóis: A) principais flavanóis encontrados em uvas; B) principais proantocianidinas e seus radicais ligantes.



Adaptado de: Cabrita, Ricardo-da-Silva e Laureano (2003); Burin (2010).

## 5.4.2. ÁCIDOS FENÓLICOS E ESTILBENOS

### *Ácidos fenólicos*

Nas uvas e derivados, encontram-se, principalmente, os ácidos hidroxicinâmicos que se encontram nos vacúolos das células das cascas e polpas, sob a forma de ésteres tartáricos, também denominados de hidroxicinamatos (ácidos caftárico, fertárico e cutárico) (RIBÉREAU-GAYON, 1965). Entre os derivados do ácido benzóico, os mais importantes são os ácidos vanílico, siríngico e salicílico, que aparecem ligados às paredes celulares e, principalmente, o ácido gálico, que se encontra sob a forma de éster dos flavanóis (CABRITA; RICARDO-DA-SILVA; LAUREANO, 2003).

Nos sucos e vinhos, devido à hidrólise dos derivados tartáricos também se encontram as formas livres (ácidos cafeico, ferrúlico, e *p*-cumárico). A principal função destes compostos é a participação nas reações de oxidação que conduzem ao acastanhamento de mostos e vinhos e nas reações de copigmentação com antocianinas (SINGLETON, 1987; JACKSON, 2008).

Embora não exerçam influência direta no sabor de sucos e vinhos, os ácidos fenólicos estão relacionados ao aparecimento de fenóis voláteis com consequentes alterações aromáticas (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006). São os compostos fenólicos mais importantes nos sucos e vinhos brancos por se encontrarem, sobretudo, na polpa das uvas. Apesar de suas baixas concentrações, os ácidos fenólicos têm relevância no aroma e gosto dos derivados (CABRITA; RICARDO-DA-SILVA; LAUREANO, 2003).

Em uvas e derivados *V. labrusca* L., encontram-se, principalmente, os ácidos *p*-cumárico, cafeico e gálico (Figura 10A) (NIXDORF; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, 2010; ROCKENBACH et al., 2011a; ROCKENBACH et al., 2011b; NATIVIDADE et al., 2013).

### *Estilbenos*

Da classe dos estilbenos, destaca-se o resveratrol, composto majoritário nas uvas, sucos e vinhos, principalmente tintos. O resveratrol é uma fitoalexina sintetizada naturalmente em uvas, sob duas formas isômeras: *trans*-resveratrol (*trans*-3,5,4'-trihidroxiestilbeno) e *cis*-

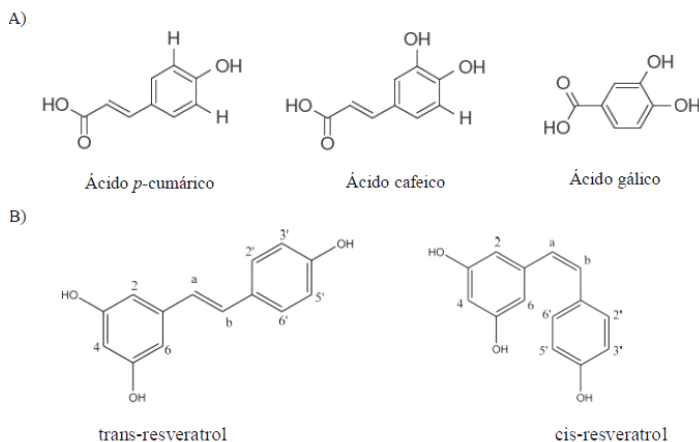
resveratrol (cis-3,5,4'-trihidroxiestilbeno) (Figura 10B), que podem estar na forma livre ou glicosilada (MORENO; CASTRO; FALQUÉ, 2008).

Desde a década de 1990, o fenólico resveratrol é extensivamente estudado em uvas e derivados frente a evidências de suas propriedades bioativas, como as atividades antioxidante, anti-inflamatória e anticarcinogênica, efeitos cardioprotetores e inibição da agregação plaquetária (PACE-ASCIK et al., 1996; SAUTTER et al., 2005; DAGLIA, 2011).

A concentração de resveratrol na uva e derivados pode variar de acordo com fatores climáticos, variedade da uva, condições de cultivo e de processamento (SHAHIDI; NACZK, 1995).

Processos de pasteurização e concentração, assim como outros processos a quente, como a prensagem e a maceração, permitem maior extração de polifenóis das cascas de uva (MARZAROTTO, 2005; SAUTTER et al., 2005).

Figura 10. Ácidos fenólicos e estilbenos. A) ácidos fenólicos derivados dos ácidos cinâmico e benzóico; B) isômeros do resveratrol, da classe dos estilbenos.



Adaptado de: Cabrita, Ricardo-da-Silva e Laureano (2003); Burin (2010).

O suco de uva é considerado uma boa fonte de resveratrol, embora apresente menores concentrações do composto em relação aos vinhos. Assim como glicosídeos de flavonóides, os glicosídeos de

resveratrol e o trans-resveratrol podem ser absorvidos do suco de uva pelo intestino delgado, em concentrações biologicamente ativas (PACE-ASCIAC et al., 1996; MANACH et al., 2005; SAUTTER et al., 2005).

Segundo Sautter et al. (2005), a concentração de *trans*-resveratrol em sucos de uva produzidos em diferentes estados brasileiros variou de 0,19 a 0,90 mg L<sup>-1</sup>, entre os sucos integral, reprocessado e adoçado, com maior concentração de isômeros *cis* e *trans*-resveratrol no suco reprocessado.

Em estudo com sucos tinto e branco de uvas *V. labrusca* L., Dani et al. (2007) demonstraram que os sucos de uva orgânicos apresentaram maiores concentrações de resveratrol e antocianinas em relação aos sucos convencionais.

## 6. ESPÉCIES REATIVAS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Espécies reativas ou radicais livres são definidos como átomos ou moléculas que apresentam um ou mais elétrons desemparelhados em sua órbita externa. São compostos altamente instáveis, de meia-vida curta e quimicamente muito reativos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990). A geração de radicais livres constitui um processo contínuo e fisiológico, com importantes funções nos processos metabólicos. Em condições normais ou de homeostase redox, a geração de radicais livres nos organismos ocorre devido a fatores endógenos, como presença de íons metálicos livres, processos inflamatórios, atividade respiratória e metabolismo de xenobióticos, e a fatores exógenos, como radiação, poluição e tabagismo (SIES, 1993; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; TAKASHIMA et al., 2012).

Os radicais livres são capazes de oxidar aleatoriamente moléculas biológicas essenciais como lipídios, proteínas, glicosídeos e ácidos nucleicos, o que resulta na perda de suas funções fisiológicas e indução de efeitos deletérios (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Os radicais livres de maior importância biológica compreendem as espécies reativas de oxigênio (ERO) e as espécies reativas de nitrogênio (ERN). Entre as espécies reativas de oxigênio, destaca-se o radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), o radical hidroxila (HO<sup>•</sup>) e o oxigênio singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) (SILVEIRA, 2004). Entre as espécies reativas de nitrogênio, o radical óxido nítrico (NO<sup>•</sup>) e o peróxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) são principalmente descritos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990).

Os efeitos nocivos de radicais livres sobre os sistemas biológicos têm sido relacionados à etiologia de algumas doenças crônico-degenerativas, como diabetes *melitus* e a doença de Alzheimer, e com o envelhecimento precoce, relacionadas ao aumento dessas espécies reativas nos organismos aeróbios e ao estresse oxidativo (GRIS, 2010; TAKASHIMA et al., 2012). No estresse oxidativo ocorre o desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de radicais livres ou em detrimento de sua remoção (SIES, 1993; BARBOSA et al., 2010).

Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias capazes de retardar ou inibir a oxidação de substratos oxidáveis, podendo ser enzimáticos ou não enzimáticos, como  $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -caroteno, ácido ascórbico, e glutatona reduzida (GSH) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

Quanto aos mecanismos de ação para a homeostase redox, os antioxidantes podem atuar na prevenção da oxidação, suprimindo a formação de ERO e ERN, pela redução do  $H_2O_2$  em  $O_2$  e  $H_2O$  e do peróxido lipídico ( $LOO\bullet$ ) a hidróxido lipídico (LOOH), ou por ação queladora de íons metálicos como ferro e cobre. Os antioxidantes com ação sequestradora de radicais livres removem rapidamente espécies reativas impedindo o ataque a moléculas biológicas (NIKI, 2010). Antioxidantes naturais como os compostos fenólicos, cujas propriedades antioxidantes são essencialmente relacionadas ao número e à disposição de grupamentos hidroxila em seus anéis, atuam na remoção de radicais livres deletérios, como o oxigênio  $^1O_2$  (NORDBERG; ARNER, 2001; RODRIGO; BOSCO, 2006).

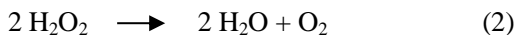
Organismos aeróbios contam com sistema de defesas antioxidantes constituído por proteínas, como a ferritina e a ceruloplasmina, enzimas e moléculas menores como a glutatona reduzida (GSH), ácido úrico e as vitaminas C e E (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; TAKASHIMA et al., 2012). O sistema antioxidante enzimático inclui a ação das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx), glutatona redutase (GR), glutatona S-transferase (GST), superóxido redutase, e peroxirredoxina, que participam na remoção do excesso de radicais reativos (SIES, 1993; NORDBERG; ARNER, 2001; BONNEFOY; DRAI; KOSTKA, 2002).

No sistema enzimático, a SOD atua como principal defesa antioxidante contra o excesso do radical superóxido, subproduto do metabolismo aeróbio. São conhecidas três isoformas da enzima, duas contendo os metais Cu e Zn, encontradas nos fluidos extracelulares e no

citossol, e uma isoforma contendo Mn encontrada no interior de mitocôndrias, sítio de ativação de produção de radicais  $O_2^{\bullet-}$ . Ambas as isoformas de SOD catalisam a dismutação de  $O_2^{\bullet-}$  a  $H_2O_2$ , como mostra a reação 1 (McCORD; FRIDOVICH, 1969; LÖNN; DENNIS; STOCKER, 2012):



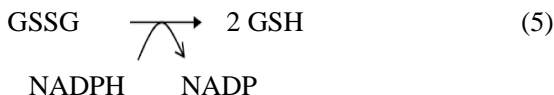
A catalase, uma hidroxidase intracelular de ampla distribuição tecidual, com elevada atividade no fígado, rim e hemácias, é encontrada predominantemente nos peroxissomos celulares e atua convertendo  $H_2O_2$  em  $O_2$  e  $H_2O$ , com elevada taxa catalítica, conforme a reação 2 (LÖNN; DENNIS; STOCKER, 2012):



A GPx, cuja estrutura apresenta resíduo de selenocisteína, utiliza a glutatona para reduzir peróxidos e hidroperóxidos (ROOH), protegendo também contra danos causados por radicais peróxinitrito. A enzima utiliza glutatona reduzida (GSH) como doador de elétrons, com formação de glutatona oxidada (GSSG) e água (reações 3 e 4) (SIES, 1993; LÖNN; DENNIS; STOCKER, 2012):



A GR catalisa a reação de regeneração de GSH a partir de GSSG, com elétrons fornecidos pelo ciclo das pentoses a partir de moléculas de nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH), conforme a reação 5 (GAETANI; PARKER; KIRKMAN, 1974):



Compreendendo o sistema antioxidante não enzimático, a glutatona reduzida é um peptídeo hidrossolúvel, presente em

concentrações na ordem de  $\text{mmol L}^{-1}$ , e um dos antioxidantes protéicos mais importantes das células. A GSH atua na remoção direta de radicais livres, servindo também como agente redutor para as enzimas GPx e GR (SIES, 1993; LÖNN; DENNIS; STOCKER, 2012).

As enzimas envolvidas no metabolismo da GSH são importantes para manter o estado redox celular. A razão GSH/GSSG é utilizada como um índice de estresse oxidativo, onde a ativação de GR aumenta o nível de GSH, modulando a ação da GPx e reduzindo o estresse oxidativo (SIES, 1993; LÓPEZ-ALARCÓN; DENICOLA, 2013).

O ácido úrico, produto do metabolismo de nucleotídeos, apresenta importante atividade antioxidante, sendo sua concentração no plasma sanguíneo superior às concentrações de vitaminas C e E. Em pH fisiológico, apresenta-se como um monoânion, o urato, atuando como um antioxidante seletivo, particularmente contra radicais hidroxil e ácido hipocloroso (SIES, 1993; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; SILVEIRA, 2004).

Diversos métodos químicos são empregados na determinação da atividade antioxidante *in vitro* de compostos, extratos e alimentos. Esses métodos podem ser baseados na captura de radicais livres, como na determinação da capacidade de absorção de radical de oxigênio (ORAC) ou da capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC); e no poder de redução de íons metálicos, como na determinação do poder antioxidante de redução do íon férrico (FRAP).

Embora esses métodos sejam particularmente úteis na caracterização e comparação de amostras, a atividade antioxidante determinada por ensaios químicos não permite extrapolar verdadeiramente o desempenho de uma amostra *in vivo*. Além disso, uma vez que a atividade antioxidante inclui a modulação de enzimas desintoxicantes endógenas e a modulação da sinalização celular e expressão gênica, ensaios *in vivo* e em modelo celulares são especialmente necessários, a fim de determinar o potencial antioxidante bioativo de um composto ou extrato (LÓPEZ-ALARCÓN; DENICOLA, 2013).

## **7. PROPRIEDADES BIOATIVAS DE COMPOSTOS FENÓLICOS DA UVA**

Diversos estudos epidemiológicos relatam correlação positiva entre a ingestão de alimentos ricos em polifenóis e a redução do risco de doenças crônico-degenerativas, como câncer, diabetes e aterosclerose



(RIMM, 2002; MANACH et al., 2005; CHIRA et al., 2008). Polifenóis da uva são associados a uma variedade de ações biológicas como atividade antioxidante, quelação de metais e modulação de atividade enzimática, influência na transdução de sinal celular, ativação de fatores de transcrição e expressão gênica (RODRIGO; BOSCO, 2006; HAKIMUDDIN et al., 2008; JACOB et al., 2008; RODRIGO; MIRANDA; VERGARA, 2011).

Evidências científicas sugerem que compostos fenólicos obtidos através da dieta são responsáveis pelos benefícios à saúde relacionados à modulação de importantes parâmetros fisiológicos como: funções vasculares e plaquetária; pressão sanguínea e perfil lipídico; e aumento da resistência ao estresse oxidativo, processos inflamatórios e disfunções endoteliais (VAN DUYNHOVEN et al., 2010; KEMPERMAN et al., 2013).

As propriedades bioativas de polifenóis são extensamente estudadas em uvas e seus constituintes, extratos e vinhos, principalmente de variedades *V. vinifera* L. Os compostos fenólicos são responsáveis pela elevada atividade antioxidante *in vitro* de vinhos de uvas viníferas (REVILLA; RYAN, 2000; CADAHIA et al., 2009; BURIN et al., 2010; GRIS et al., 2011a; GRIS et al., 2011b; ARCARI et al., 2013). Não obstante, um elevado potencial antioxidante *in vitro* foi reportado para uvas, vinhos e sucos de variedades *V. labrusca* L. (NIXDORF; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, 2010; ROCKENBACH et al., 2011b; LIMA et al., 2014).

Com relação ao potencial bioativo *in vivo*, diferentes estudos de intervenção em animais, em que foi administrado vinho ou suco de uva, relataram efeitos biológicos benéficos sobre a oxidação proteica e de lipídios e a atividade antioxidante *in vivo*, associados aos compostos fenólicos (VINSON; TEUFEL; WU, 2001; DANI et al., 2008; CHU et al., 2012; GRIS et al., 2013; BUCHNER et al., 2014). Um estudo com roedores mostrou que polifenóis do suco de uva são capazes de suprimir o crescimento de células cancerosas e reduzir o estresse oxidativo em células mamárias (JUNG; WALLIG; SINGLETARY, 2006).

Propriedades bioativas de polifenóis também foram verificadas em humanos. Os benefícios associados ao consumo de vinhos, como o aumento da capacidade antioxidante sérica, efeito hipolipidemiante, e redução do estresse oxidativo com consequente melhora da homeostase redox, são bastante reportados (NOGUER et al., 2012; CHIVA-BLANCH et al., 2013; DI RENZO et al., 2015).

Em pesquisas com diferentes sucos de uva, estudos clínicos com indivíduos saudáveis e pacientes em hemodiálise demonstraram que compostos fenólicos do suco de uva aumentaram a capacidade antioxidante e reduziram os níveis de colesterol e marcadores pró-inflamatórios (BUB et al., 2001; CASTILLA et al., 2006; SOUZA, 2008). Em pesquisa *ex vivo*, Dani et al. (2007) associaram a inibição da peroxidação lipídica em soro humano ao conteúdo de compostos fenólicos presente em diferentes sucos de uva de variedades *V. labrusca* L. Em outro estudo, o consumo de suco concentrado de uva Concord aumentou a atividade antioxidante sérica e a proteção contra a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL), e reduziu a agregação plaquetária e a adesão epitelial, demonstrando potencial antioxidante comparável ao do  $\alpha$ -tocoferol (O'BYRNE et al., 2002).

Diversos estudos reportam as propriedades bioativas do suco de uva de diferentes variedades e seus benefícios à saúde, geralmente, em relação à atividade antioxidante. Dani et al. (2008) avaliaram diversos parâmetros nutricionais e antioxidantes em sucos brancos, rosados e tintos, convencionais e orgânicos, sendo que os tintos, em geral, apresentaram maior conteúdo fenólico com relação aos brancos e rosados, bem como os orgânicos em comparação aos convencionais.

Em testes *in vitro*, sucos de uva tintos, notadamente os sucos orgânicos, apresentaram maior atividade antioxidante, comprovando a correlação positiva entre compostos fenólicos totais, resveratrol e catequinas. Testes *ex vivo* demonstraram que sucos de uva brancos apresentam maior atividade semelhante à catalase, verificada pela maior taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio. Contudo, entre os sucos tintos, os orgânicos demonstraram maior proteção à oxidação por este mecanismo, demonstrando correlação positiva com o conteúdo de resveratrol (DANI et al., 2007).

## 7.1. POLIFENÓIS E DOENÇAS CARDIOVASCULARES

As doenças cardiovasculares (DCV) são as principais causas de morbidade e morte no mundo ocidental. Estudos de mapeamento global de doenças realizados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) indicam que o número de óbitos por doenças cardiovasculares em países em desenvolvimento deve aumentar em mais de 60% entre os anos 2000 e 2020 (SILVA et al., 2006). Na América Latina, onde os países progredem em rápida transição econômica e demográfica, as doenças cardiovasculares devem continuar a crescer em importância (PRAMPARO et al., 2006).

No Brasil, as doenças cardiovasculares, especialmente doenças isquêmicas e cerebrovasculares, foram responsáveis por 31,2% da taxa de mortalidade registrada em 2010, com um fator de risco estimado em 206,1 e 160,2, a cada 100 mil indivíduos, para homens e mulheres, respectivamente (MANSUR; FAVARATO, 2012).

Entre as principais DCVs, a aterosclerose é uma doença isquêmica progressiva caracterizada pela formação de placas ateroscleróticas (ateromas) na estrutura dos vasos sanguíneos devido ao acúmulo de lipídios oxidados, macrófagos, linfócitos, elementos fibrosos e inflamatórios em resposta à injúria endotelial vascular. Condições de estresse oxidativo e a ativação da cascata inflamatória associadas à hiperlipidemia, hipertensão arterial e diabetes *mellitus* estão envolvidos na etiologia da aterosclerose (GOTTLIEB; BONARDI; MORIGUCHI, 2005). No endotélio, que compõe a túnica íntima dos vasos sanguíneos formando um revestimento interno de camada única de células endoteliais, a ativação do fator nuclear de transcrição  $\kappa\beta$  (NF- $\kappa\beta$ ) e a ação de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina 1 (IL-1), interleucina 8 (IL-8) e interferon  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), aceleram a formação de ateromas (TABRUYN et al., 2009; HAJJAR; GOTTO, 2013).

Pesquisas comprovam que os principais polifenóis da uva com efeitos bioativos sobre marcadores cardiovasculares compreendem o resveratrol e a quercetina. Estudos de mecanismos metabólicos em células endoteliais demonstraram efeitos biológicos benéficos do resveratrol e quercetina na angiogênese (SCODITTI et al., 2012); na migração celular (MOJZIS et al., 2008); sobre marcadores de vasorelaxamento (XU; IKEDA; YAMORI, 2007; KLINGE et al., 2008; DULUC et al., 2013); e fatores inflamatórios (SCODITTI et al., 2012).

Em cultura de células endoteliais, a inibição de metaloproteinases e ciclooxigenases responsáveis pela degradação de componentes da matriz extracelular e regulação da angiogênese foi associada à ação anti-inflamatória dos compostos resveratrol e quercetina, demonstrando efeito protetivo nos processos de aterosclerose e câncer (SCODITTI et al., 2012). Não obstante, foi demonstrado que as antocianinas malvidina e cianidina exercem importante efeito na migração celular e indução da enzima endotelial óxido nítrico sintase (eNOS) (XU; IKEDA; YAMORI, 2007; MOJZIS et al., 2008), e as catequinas exercem ação inibitória sobre fatores inflamatórios (NEGRÃO et al., 2013).

Em estudo com suco de uva, foi demonstrado que os polifenóis exercem efeitos bioativos na redução dos riscos de doenças coronárias, inibição da agregação plaquetária, estimulação da função endotelial, indução de vasodilatação dos vasos arteriais e inibição da oxidação do colesterol em pacientes portadores de doenças cardiovasculares (STEIN et al.,1999). Em estudo sobre funções autonômicas cardiovasculares, Dillenburg et al. (2013) avaliaram a frequência cardíaca, a pressão arterial sistólica e a sensibilidade do barorreflexo na veia e artéria femoral de ratos tratados com suco de uva ou resveratrol, em concentração equivalente a do suco, administrados por via oral, durante 30 dias. Em ambos os grupos, foi verificada a modulação das funções autonômicas e melhora dos parâmetros cardiovasculares, considerados importantes marcadores de dano e mortalidade de órgãos do sistema circulatório. Os autores destacaram que a melhora na função de sensibilidade do barorreflexo somente foi verificada no grupo tratado com resveratrol.

## **8. CULTIVO DE CÉLULAS E BIODISPONIBILIDADE DE POLIFENÓIS**

O cultivo de células e tecidos teve início no século XX. Em 1907, o biólogo americano Ross Granville Harrison conduziu os primeiros experimentos que consistiam no cultivo de tecidos fragmentados de animais em frascos contendo seus fluídos biológicos. A técnica foi desenvolvida a fim de estudar o comportamento de células animais fora do organismo, em um meio ambiente controlado, e compreende atualmente uma poderosa ferramenta de pesquisas biológicas (ALVES; GUIMARÃES, 2011).

Em relação a características celulares e de cultivo, as células podem ser aderentes ou não aderentes, podendo ser cultivadas em frascos ou garrafas ou em suspensão em um meio de cultura líquido, respectivamente. As culturas celulares são classificadas em primárias, finitas, contínuas e transformadas (FUNCHAL; DANI, 2014).

Culturas primárias são provenientes do crescimento de células derivadas diretamente de um fragmento de tecido, obtido por desagregação mecânica, química ou enzimática. São constituídas por células diploides, que apresentam as características genotípicas e fenotípicas do tecido de origem. As culturas finitas são derivadas da primeira passagem ou replicação de uma cultura primária, apresentando potencial proliferativo mais curto e finito (FUNCHAL; DANI, 2014).

As culturas contínuas ou permanentes compreendem células de alta capacidade proliferativa, que resistiram aos processos de desagregação e replicação, adaptando-se ao meio de cultivo, e que ainda mantêm as características do tecido de origem. São euploides, apresentando número de cromossomos múltiplo do número presente nas células de origem. Essas células dão origem às células transformadas, a partir da transformação celular originando mutações em genes responsáveis pelo controle do ciclo. As culturas transformadas não mantêm as características morfológicas e genéticas do tecido original e adquirem uma capacidade proliferativa exacerbada associada à tumorigenicidade. A transformação ou imortalização das células pode ser induzida por vírus, substâncias químicas ou agentes físicos, como a luz ultravioleta (ALVES; GUIMARÃES, 2011; FUNCHAL; DANI, 2014).

Atualmente, inúmeros modelos *in vitro* empregando diversas linhagens celulares, especialmente linhagens humanas, são aplicados em pesquisas com polifenóis. Estas podem compreender estudos de citotoxicidade, de absorção, de biodisponibilidade e metabólica, bem como de bioatividade e terapêutica.

Em relação aos polifenóis provenientes da dieta, é importante considerar que uns dos principais fatores que influenciam os efeitos biológicos de compostos fenólicos *in vivo* compreendem a biodisponibilidade e o destino metabólico, uma vez que esses compostos devem ser liberados da matriz alimentar após a ingestão do alimento e absorvidos durante a passagem pelo trato gastrointestinal para tornarem-se biodisponíveis (PANDEY; RIZVI, 2009). Biodisponibilidade compreende a taxa ou extensão que um composto é absorvido e metabolizado para tornar-se disponível na circulação sistêmica e atingir um sítio de ação específico ou tecido alvo (RANG; DALE, 2007).

No organismo humano, os compostos fenólicos são submetidos a extensas modificações durante os processos absorptivos. Na passagem intestinal, limitante da absorção sistêmica, os compostos fenólicos sofrem reações de conjugação no interior das células intestinais ou enterócitos, a partir de reações de metilação, sulfatação e glucuronidação (PANDEY; RIZVI, 2009). Estas reações facilitam a excreção e limitam a toxicidade desses compostos (SCALBERT et al., 2002).

Os enterócitos compreendem células epiteliais especializadas presentes na camada superficial dos intestinos delgado e grosso, formando uma barreira absorptiva em contato com o lúmen intestinal.

Suas membranas celulares são dotadas de transportadores capazes de transportar moléculas do lúmen intestinal ao interior das células, através da membrana apical, e do citosol em direção à corrente sanguínea, através da membrana basolateral (KIERSZENBAUM; TRES, 2012).

Os mecanismos de transporte transcelular em enterócitos envolvem quatro tipos de processos: (1) difusão passiva, (2) transporte mediado por carreadores, (3) transporte paracelular, e (4) endocitose. A difusão passiva é o mecanismo predominante, compreendendo um processo dependente do gradiente de concentração e que não necessita da ação de carreadores e do consumo de energia metabólica (KWON, 2002).

Os mecanismos de absorção e a biodisponibilidade de compostos fenólicos são amplamente estudados *in vitro* empregando linhagens de células contínuas humanas, como as células de adenocarcinoma de cólon humano (Caco-2). Em cultura, essas células formam uma monocamada de células epiteliais aderentes, sendo utilizadas como modelo do epitélio intestinal, uma vez que, após confluência e sob determinadas condições de cultivo, estas células diferenciam-se espontaneamente em enterócitos (CHANTRET et al., 1988). A diferenciação resulta em polaridade nas membranas apical e basolateral das células Caco-2, separadas por junções estreitas. Na parte apical, desenvolve-se uma borda em escova com microvilosidades que produzem hidrolases digestivas específicas. Proteínas de transporte, receptores de enzimas, canais de íons e moléculas lipídicas também estão situados na parte apical (VAN BREEMEN; LI, 2005).

A monocamada de células Caco-2 compreende um modelo bem estabelecido para estudos de absorção *in vitro* e é capaz de gerar informações úteis, a fim de prever mecanismos *in vivo* (STORNILO; MORENO, 2012).

Embora evidências *in vitro* corroborem o potencial bioativo de compostos fenólicos, uma grande desvantagem dos estudos atuais é a utilização de polifenóis em sua forma molecular, naturalmente encontrada nas matrizes alimentares, ao invés de sua forma biodisponível na corrente sanguínea. Isto é particularmente importante, uma vez que os polifenóis sofrem excessivo metabolismo pela microbiota intestinal e células epiteliais do intestino, resultando em metabólitos biodisponíveis na circulação com potenciais efeitos biológicos (MANACH et al., 2005; KOSINSKA; ANDLAUER, 2012).

## CAPÍTULO 2

### **EFFECT OF GRAPE SEEDS ON THE POLYPHENOL BIOACTIVE CONTENT AND ELEMENTAL COMPOSITION BY ICP-MS OF GRAPE JUICES FROM *VITIS LABRUSCA* L.**

Isabela Maia Toaldo<sup>a</sup>, Oinei Fogolari<sup>a</sup>, Gabriela Cadore Pimentel<sup>a</sup>,  
Jefferson Santos de Gois<sup>b</sup>, Daniel L.G. Borges<sup>b</sup>, Vinícius Caliar<sup>c</sup>,  
Marilde Bordignon-Luiz<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Department of Food Science, Federal University of Santa Catarina, Rod. Admar Gonzaga, 1346 Itacorubi, Florianópolis, SC, Brazil.

<sup>b</sup>Department of Chemistry, Federal University of Santa Catarina, Av. Des. Vitor Lima, 476 Trindade, Florianópolis, SC, Brazil.

<sup>c</sup>Laboratory of Quality Control of Beverages and Vinegars, Experimental Station of Videira, Agricultural Research Governmental Company of Santa Catarina State e EPAGRI, Videira, SC, Brazil.





OS RESULTADOS OBTIDOS NESSE TRABALHO ESTÃO PUBLICADOS NO PERIÓDICO LWT – FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY.

Artigo publicado: TOALDO, I.M.; FOGOLARI, O.; PIMENTEL, G.C.; DE 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*, 2013. DOI: 10.1016/j.lwt.2013.02.028.

















## **CAPÍTULO 3**

### **PHYTOCHEMICAL POLYPHENOL EXTRACTION AND ELEMENTAL COMPOSITION OF *VITIS LABRUSCA* L. GRAPE JUICES THROUGH OPTIMIZATION OF PECTINOLYTIC ACTIVITY**

Isabela Maia Toaldo, Jefferson Santos de Gois, Odinei Fogolari, Daniele Hamann, Daniel L. G. Borges, Marilde T. Bordignon-Luiz

I.M. Toaldo; O. Fogolari; D. Hamann; M.T. Bordignon-Luiz.  
Department of Food Science, Federal University of Santa Catarina, Rod.  
Admar Gonzaga, 1346 Itacorubi, Florianópolis, SC 88034-001, Brazil.  
J.S. de Gois; D.L.G. Borges. Department of Chemistry, Federal  
University of Santa Catarina, Av. Des. Vitor Lima, 476 Trindade,  
Florianópolis, SC 88040-900, Brazil.



OS RESULTADOS OBTIDOS NESSE TRABALHO ESTÃO PUBLICADOS NO PERIÓDICO FOOD AND BIOPROCESS TECHNOLOGY.

Artigo publicado: TOALDO, I.M.; DE GOIS, J.S.; FOGOLARI, O.; HAMANN, D.; BORGES, D.L.G.; BORDIGNON-LUIZ, M.T. Phytochemical polyphenol extraction and elemental composition of *Vitis labrusca* L. grape juices through optimization of pectinolytic activity. *Food and Bioprocess Technology*, 2014. DOI: 10.1007/s11947-014-1288-8.

















## CAPÍTULO 4

### **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**

Isabela Maia Toaldo<sup>a</sup>, Fernanda Alves Cruz<sup>b</sup>, Tatiana de Lima Alves<sup>b</sup>,  
Jefferson Santos de Gois<sup>c</sup>, Daniel L.G. Borges<sup>c,d</sup>, Heloisa Pamplona  
Cunha<sup>b</sup>, Edson Luiz da Silva<sup>b</sup>, Marilde T. Bordignon-Luiz<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Admar Gonzaga Rd., 1346, Itacorubi, 88034-001 Florianópolis, SC, Brasil.

<sup>b</sup>Departamento de Análises Clínicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Delfino Conti St., Trindade, 88040-900 Florianópolis, SC, Brasil.

<sup>c</sup>Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Des. Vitor Lima Av., Trindade, 88040-900 Florianópolis, SC, Brasil.

<sup>d</sup>INCT de Energia e Ambiente do CNPq, Florianópolis-SC, Brasil.



OS RESULTADOS OBTIDOS NESSE TRABALHO ESTÃO PUBLICADOS NO PERIÓDICO FOOD CHEMISTRY.

Artigo publicado: TOALDO, I.M.; CRUZ, F.A.; ALVES, T.L.; DE GOIS, J.S.; BORGES, D.L.G.; CUNHA, H.P.; DA 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*, 2015. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.09.171.























## CAPÍTULO 5

### **ACUTE CONSUMPTION OF GRAPE JUICES OF TROPICAL VARIETIES *V. LABRUSCA* L. ASSOCIATED WITH RAPID IMPROVEMENT OF REDOX HOMEOSTASIS AND SUSTENANCE OF GLYCAEMIC AND URATE STATUSES IN HUMANS**

Isabela Maia Toaldo<sup>a</sup>, Fernanda Alves Cruz<sup>b</sup>, Edson Luiz da Silva<sup>b</sup>,  
Marilde T. Bordignon-Luiz<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Food Science and Technology, Federal University of Santa Catarina, Admar Gonzaga Rd., 1346, Itacorubi, 88034-001, Florianópolis, SC, Brazil.

<sup>b</sup>Department of Clinical Analysis, Federal University of Santa Catarina, Delfino Conti St., Trindade, 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil.







## Abstract

This study examined the acute effects of tropical grape juices of *V. labrusca* L. on modulation of enzymatic and nonenzymatic antioxidants and glycaemic status in humans through a randomized crossover controlled intervention trial. Red grape juices of Isabel and Bordo varieties were used as intervention samples in comparison with a control (water). In a first set of experiments, the kinetics of antioxidant biomarkers after juice ingestion was monitored through time in 5 healthy volunteers. For the controlled trial, glycaemic and uric acid levels, plasmatic reduced glutathione (GSH), erythrocytes antioxidant enzymes and serum total antioxidant capacity (TAC) were analyzed in blood samples at fasting and 1-h post intervention in 24 healthy individuals. The intake of grape juices significantly increased antioxidant status in both plasma and serum, with non-significant effect on glucose and uric acid. For GSH, serum TAC and antioxidant enzymes, data showed no significant difference between juices in relation to baseline variations. The multivariate analysis confirmed the influence of phenolic classes on biological responses. Polyphenols in *V. labrusca* L. juices modulated antioxidant responses in healthy individuals, whereas the chemical differences between organic and conventional juices were not a predictive factor for its biological effects. This is the first evidence of improvement in redox homeostasis *in vivo* after consumption of Isabel and Bordo juices, with biological outcome in human health.

**Keywords:** enzymes, glucose, intervention study, organic juice, polyphenols, *V. labrusca* L.

## 1. Introduction

The oxidative stress arises due to an imbalance between oxidative species and antioxidant defenses [1, 2]. Aerobic organisms can counteract the oxidative process through endogenous and exogenous systems, consisting of enzymatic defenses such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx), and nonenzymatic antioxidants such as reduced glutathione (GSH), ascorbic acid, tocopherol, and phenolic compounds [2]. Epidemiological studies have shown that the consumption of fruits and vegetables rich in polyphenols is associated with a lower level of oxidative stress and reducing the incidence of chronic disease [3, 4].

Grapes (*Vitis* sp.) are one of the most consumed fruits worldwide and represent a very rich source of polyphenols in human dietary. The health benefits from consuming grape and grape derivatives are extensively reported regarding wines (*V. vinifera* L.) [5,6]. Polyphenols diversity in wines, which promote health effects, is mainly related to grape variety [5]. Grape polyphenols have been postulated to modulate metabolic pathways [6,7], angiogenesis [8], cell migration [9], inflammatory factors [10] and gene expression [11]. When the complex mixture of polyphenols in grapes is considered, there is lacking information on antioxidant properties *in vivo* of grape juices from tropical species, such as the *V. labrusca* L. These varieties are widely cultivated in the American continent and are traditionally destined to grape juice production. The varieties Isabel, Bordo and Concord represent the most cultivated *V. labrusca* L. red grapes and a rich source of phenolic compounds [12].

The phenolic composition in juices is influenced by ripeness of grapes, processing and environmental conditions and application of pesticides [13]. It has been reported that grape polyphenols exert bioactive properties *in vivo* and that organic cultures contain higher concentrations of bioactive polyphenols in relation to conventional cultures [13,14]. However, the biological effects of organic *V. labrusca* L. juices on antioxidant pathways have not been determined in humans. In previous studies, we have demonstrated that *V. labrusca* L. juices promote protective effects against lipid peroxidation in humans, by reducing hydroperoxides and thiobarbituric acid reactive substances [15].

In the present study, we investigated the possible differential contributions of organic and conventional grape juices of tropical varieties Isabel and Bordo (*V. labrusca* L.) on the redox homeostasis *in*

*vivo*. The effects of acute consumption of grape juices on enzymatic and nonenzymatic antioxidants were evaluated in healthy subjects through a randomized crossover controlled intervention trial. In addition, the impact of juice intake on glycaemic status and uric acid levels was assessed in order to verify whether juice carbohydrates could unfavorably affect these parameters.

## **2. Methods and materials**

### *2.1. Tropical grape juices of V. labrusca L.*

Red grape juices were produced through industrial-scale technological process using the varieties Bordo and Isabel cultivated in conventional and organic systems in São Marcos, Rio Grande do Sul, Brazil. The varietal grapes were used for juice processing at their stage of technical maturity, with 14-20 °Brix of soluble solids content. Two red grape juices were used in the study, comprising an organic juice prepared with organic Bordo grapes, and a conventional juice prepared with conventional grapes from Isabel and Bordo varieties, at juice proportion of 1:1 (v/v). Grape juices were elaborated without addition of water, sugars, flavorings or preservatives and represent the traditional *V. labrusca* L. grape juices produced in the South Region of Brazil. The chemical composition and antioxidant activity *in vitro* of the *V. labrusca* L. juices is presented in Table 1 [15].

### *2.2. Participants*

Twenty four subjects, 19 women and 5 men, aged from 20 to 55 y, were recruited from the staff of Federal University of Santa Catarina, Santa Catarina, Brazil. Screening of participants was performed with the following inclusion criteria: non-smokers, healthy subjects, with no medications or under therapeutic treatment, with body mass index ranging from 18 to 30 kg m<sup>-2</sup>. Exclusion criteria included cardiovascular disease, pregnancy, hypertension, diabetes mellitus, vegetarian diet or alcoholism. The participants were selected based on a structured interview to evaluate these criteria and were asked to continue with their habitual diets over the run-in period of 14 days. The study was registered with the Brazilian National Ethics Committee of Human Research (12703013.3.0000.0121) and all experimental protocols were

performed by a qualified professional, following established standards of biological safety. All the participants provided written informed consent.

Table 1. Chemical composition and *in vitro* antioxidant activity of tropical grape juices used in the intervention trial.

Constituents	Red grape juices	
	Organic	Conventional
Total sugar (glucose g 100g <sup>-1</sup> )	15.2 <sup>a</sup> ± 0.3	16.7 <sup>b</sup> ± 0.2
Total phenolics (GAE mg L <sup>-1</sup> )	3378.3 <sup>a</sup> ± 50.1	2015.0 <sup>b</sup> ± 21.8
Monomeric anthocyanins (mg L <sup>-1</sup> )	1545.7 <sup>a</sup> ± 69.0	419.0 <sup>b</sup> ± 9.8
Flavonols (mg L <sup>-1</sup> )	14.6 <sup>a</sup> ± 1.1	14.3 <sup>a</sup> ± 2.1
Flavanols (mg L <sup>-1</sup> )	554.0 <sup>a</sup> ± 32.1	94.3 <sup>b</sup> ± 31.0
Phenolic acids (mg L <sup>-1</sup> )	775.1 <sup>a</sup> ± 42.5	361.5 <sup>b</sup> ± 7.5
Organic acids (g L <sup>-1</sup> )	8.2 <sup>a</sup> ± 0.3	4.7 <sup>b</sup> ± 0.2
<i>trans</i> -resveratrol (mg L <sup>-1</sup> )	3.7 <sup>a</sup> ± 0.2	2.2 <sup>b</sup> ± 0.1
<i>Antioxidant activity</i> (TE mmol L <sup>-1</sup> )		
DPPH	54.2 <sup>a</sup> ± 0.2	40.7 <sup>b</sup> ± 0.7
ABTS	51.9 <sup>a</sup> ± 0.3	31.1 <sup>b</sup> ± 0.2
<i>Macrominerals</i> (mg L <sup>-1</sup> )		
Na	6.7 <sup>a</sup> ± 0.4	3.7 <sup>b</sup> ± 0.1
Ca	55.3 <sup>a</sup> ± 0.9	57.1 <sup>a</sup> ± 0.8
K	26.1 <sup>a</sup> ± 0.2	23.5 <sup>b</sup> ± 0.1
Mg	105.5 <sup>a</sup> ± 0.9	90.8 <sup>b</sup> ± 0.9
<i>Microminerals</i> (µg L <sup>-1</sup> )		
Fe	1082.7 <sup>a</sup> ± 9.7	1174.7 <sup>b</sup> ± 12.4
Zn	620.7 <sup>a</sup> ± 1.1	662.7 <sup>b</sup> ± 0.5
Mn	3307.5 <sup>a</sup> ± 22.4	1700.0 <sup>b</sup> ± 12.1
Co	1.2 <sup>a</sup> ± 0.1	4.3 <sup>b</sup> ± 0.2
Se	5.0 <sup>a</sup> ± 2.9	2.9 <sup>a</sup> ± 1.4

<sup>a,b,c</sup>Mean values within a row with different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).

### 2.3. Study design

In a pilot experiment, the kinetics changes in antioxidant and biochemical parameters after grape juice ingestion were monitored in five healthy volunteers, three women and two men. After 10-h fasting, baseline blood samples were collected by aseptic venipuncture using a

vacuum system (Vacutainer BD, Sao Paulo, Brazil). Subsequently, volunteers were given 400 mL of *V. labrusca* L. red grape juice in a single dose and blood samples were periodically collected (0-180 min) to monitor alterations in concentrations of plasmatic GSH, serum total antioxidant capacity (TAC), glucose and uric acid. No food was taken during the sampling period. The volunteers were oriented to refrain from polyphenol-rich food or beverage and alcoholic drinks for three days prior to the experiment with grape juice. The kinetics experiment was used to establish the study protocols.

Thereafter, the study consisted of a randomized crossover controlled trial of three interventions in a repeated measures design, with a run-in period of 14 days, with 24 healthy participants. All participants were part of a single group in a paired system and the interventions consisted of the ingestion of one of three samples. In each intervention, peripheral venous blood samples were collected after a 10-h fasting (baseline). Subsequently, volunteers consumed 400 mL of the test beverage (conventional red grape juice; organic red grape juice; or water) and blood samples were collected after 1 h. No food was provided during this period. The experiment was repeated with the other test beverages after a washout period of 14 days. For 3 days prior to interventions, all volunteers were advised to refrain from consuming polyphenol-rich foods, such as fruits and fruit-containing products, vegetables, chocolate, tea, coffee and honey, and any alcoholic beverage. Participants maintained a food record to provide complete information on their dietary intake throughout the study.

#### *2.4. Blood sampling*

After 10-h fasting, blood samples were collected into EDTA-containing tubes through aseptic venipuncture. The procedure was repeated after 1-h of ingestion of the testing beverage. Blood samples were immediately kept at 4°C and analyses were performed within a 1-h period. For serum measurements, blood was collected into anti-coagulant-free collection tubes and serum generated by centrifugation (1,800 x g, 10 min, 20°C). For determination of erythrocyte enzymes CAT, SOD and GPx, EDTA-blood samples were centrifuged (1,800 x g, 10 min, 4°C) and the precipitate of blood cells was washed with saline solution (pH 6.0). After centrifugation, hemolyzed erythrocytes were

resuspended in magnesium sulfate (4 nM) and acetic acid solution (1 nM).

### 2.5. Analysis of reduced glutathione and erythrocyte enzymes

The blood levels of GSH were determined as previously described [16]. Aliquots of EDTA-blood samples were acidified with trichloroacetic acid 20% (v/v) and centrifuged (5,000 x g, 10 min, 4°C). After reaction with disodium hydrogen phosphate (0.2 M) and 5,50-dithiobis,2-nitrobenzoic acid (DTNB) (1.0 M), the thiolate anion was quantified at 412 nm on a Bioplus BIO 2000 spectrophotometer (Barueri-SP, Brazil). The activity of antioxidant enzymes CAT, SOD and GPx were determined in erythrocytes and results expressed as unit of enzyme per mg of total protein. The protein content in erythrocytes was determined using the coomassie blue method, with absorbance determined at 595 nm [17]. The CAT activity was determined by monitoring the decomposition of hydrogen peroxide for 2 min at 240 nm [18]. The reaction system consisted of hemolyzed erythrocytes, phosphate buffer (pH 7.0) and hydrogen peroxide (0.3 mM). The SOD activity was determined based on the inhibition of superoxide radical reaction with epinephrine, with absorbance measured at 480 nm [19]. The GPx activity was determined using *tert*-butyl peroxide as substrate in medium containing NADPH [20]. The reaction kinetics was monitored at 340 nm and enzymatic activity was determined using the molar absorption coefficient of NADPH ( $6,220 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ).

### 2.6. Biochemical assays and serum total antioxidant capacity

Analyses of glycaemic status and uric acid levels in serum were carried out on Cobas Mira Plus biochemical analyzer (Roche, Basel, Switzerland) using the enzymatic kits Glucose Liquiform<sup>®</sup> (glucose oxidase/peroxidase) and Uric acid Liquiform<sup>®</sup> (uricase/peroxidase) (Labtest SA, Lagoa Santa, MG, Brazil). The serum TAC was determined using the ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay and expressed as Trolox equivalents ( $\mu\text{M}$ ) [21].

### 2.7. Statistical analysis

Data were analyzed using the Statistica software version 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, USA). Analysis of variance (ANOVA) for repeated measures and multiple comparisons using Tukey's HSD test were



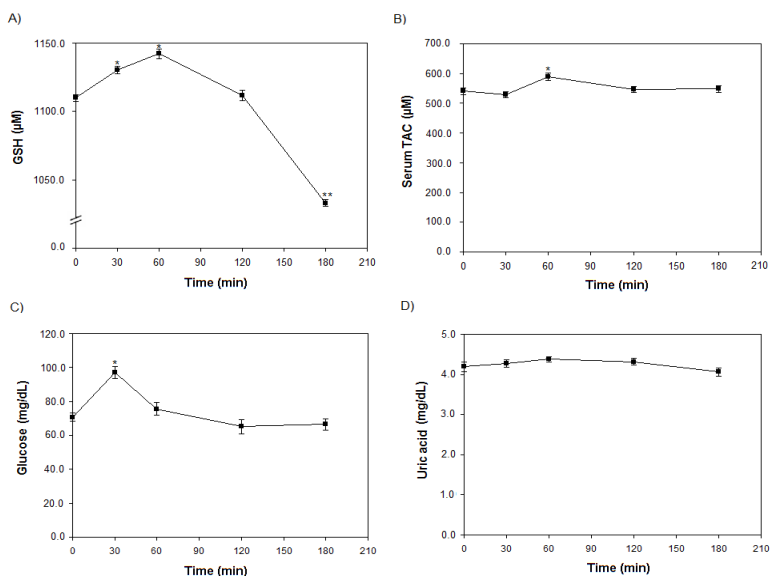
applied to compare changes in outcome variables and interventions. The paired *t*-test and Wilcoxon test were applied for parametric and non-parametric variables, respectively. Confidence intervals were regarded at 95% ( $p < 0.05$ ) and the influence of phenolic compounds on the biological responses was assessed by principal component analysis (PCA).

### 3. Results

#### 3.1. Kinetics of biomarkers after ingestion of *V. labrusca* L. red grape juice

The kinetics of antioxidant biomarkers and biochemical parameters were observed in the initial experiment with 5 healthy individuals (Fig. 1).

Fig. 1. Kinetics of antioxidant responses in healthy subjects after ingestion of *V. labrusca* L. red grape juice. (A) GSH = reduced glutathione; (B) TAC = serum total antioxidant capacity; (C) Glucose; (D) Uric acid. \*Significantly different from baseline (time zero;  $T_0$ ) ( $*p < 0.05$ ;  $**p < 0.001$ ).



After the ingestion of red grape juice, the variations through time in the concentrations of GSH, glucose, uric acid and serum TAC were monitored in blood samples of participants in order to establish the intervention study protocols. For all analyzed parameters, the inter-individual responses were significantly different after grape juice ingestion, and a significant difference in biomarkers concentrations was observed among monitored time points for each individual (data not shown).

The peak level in serum TAC was observed 60 min after grape juice ingestion, similar to the peak level of GSH (Fig. 1A). Peak levels of glucose were observed in 30 min after grape juice ingestion, however, the glycaemic status in serum showed a tendency of stabilization after 120 min (Fig. 1C). The increase of concentrations of GSH and uric acid were observed within 60 min of grape juice ingestion, with a decrease of these biomarkers after 120 min. The results suggested that grape juice polyphenols exhibit higher bioavailability approximately 60 min after ingestion. Indeed, during this period most of the phenolic compounds undergo intestinal metabolism and are released in their bioactive form in the bloodstream, being distributed to target tissues [5,22]. Hence, considering the variations observed in biochemical and antioxidant responses, the time point of 1-h after juice consumption was established for the intervention experiments.

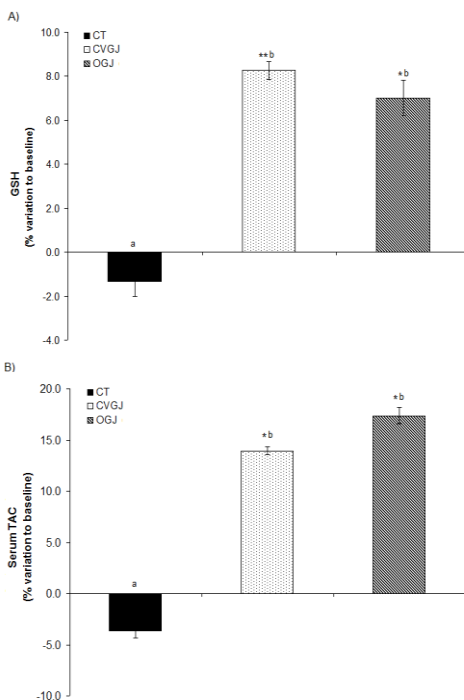
### *3.2. Effect of organic and conventional red grape juices on antioxidant biomarkers*

The effects of tropical grape juices on serum TAC and GSH concentrations are presented in Fig. 2.

The antioxidant GSH was positively affected by grape juice interventions. In relation to baseline of the trial group, plasmatic levels of GSH were increased up to 8.2% ( $p < 0.001$ ) and 7.0% ( $p < 0.05$ ) after the consumption of conventional and organic grape juices, respectively, with no significant difference between juices. Individual increases on GSH concentrations were up to 36.9% and 25.8% after the consumption of conventional and organic juices, respectively (data not shown). The augmented levels of GSH in plasma after the acute intake of tropical juices in comparison to the control intervention with water, demonstrated the effect of juice polyphenols on stimulating secretion of this protein. Similarly, the serum TAC in the trial group was significantly increased after the ingestion of juices and significantly higher in comparison to ingestion of water. After grape juice intake,

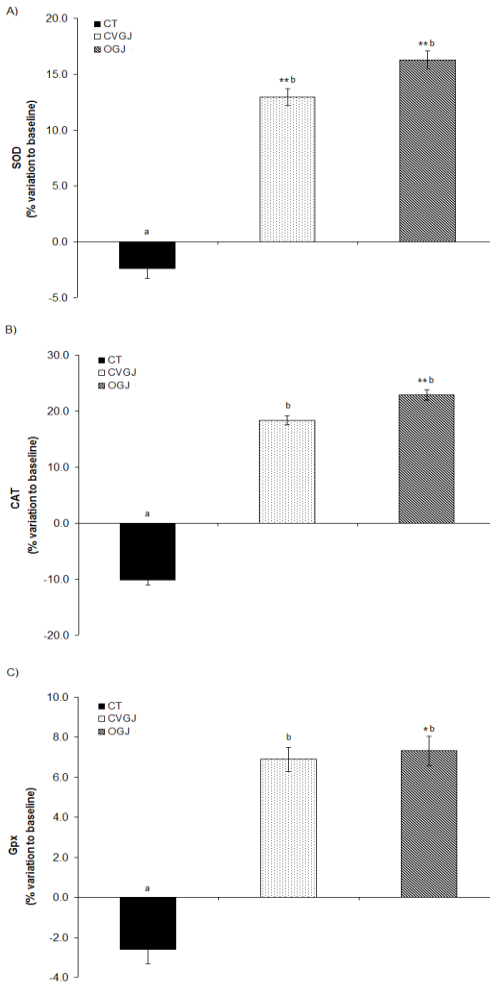
enhanced antioxidant capacity in serum was verified for all individuals, with individual increases of TAC ranging from 1.3 to 41.9% after intake of the conventional juice and from 3.2 to 59.4% after intake of the organic juice (data not shown).

Fig. 2. Variations to baseline on blood antioxidant biomarkers in the controlled intervention trial with organic and conventional tropical grape juices. (A) GSH = reduced glutathione; (B) TAC = serum total antioxidant capacity. CT = control (water); CVGJ = conventional grape juice; OGJ = organic grape juice. \*Significantly different from baseline ( $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.001$ ). <sup>a,b</sup>Significant difference among intervention samples (Tukey *post hoc* test,  $p < 0.05$ ).



The changes on antioxidant enzymes are shown in Fig. 3.

Fig. 3. Changes on antioxidant enzymes activities in relation to baseline in healthy subjects after the study interventions. (A) SOD = superoxide dismutase; (B) CAT = catalase; (C) GPx = glutathione peroxidase. CT = control (water); CVGJ = conventional grape juice; OGJ = organic grape juice. \*Significantly different from baseline ( $*p<0.05$ ;  $**p<0.001$ ). <sup>a,b</sup>Significant difference among the intervention samples (Tukey *post hoc* test,  $p<0.05$ ).



In relation to baseline values, the consumption of *V. labrusca* L. juices increased the enzymatic antioxidant activity in erythrocytes. The highest variation to baseline was verified for CAT, with a mean variation of 22% in the organic juice intervention. For CAT activity, maximal individual increases were detected up to 92.3% and 80.9% after ingestion of organic and conventional juices, respectively (data not shown). After consumption of tropical juices, the mean increases on SOD activity were  $12.9 \pm 1.0\%$  and  $16.3 \pm 1.2\%$  for conventional and organic grape juices, respectively. The overall increase of GPx activity was  $6.9 \pm 0.6\%$  after the ingestion of conventional juice and  $7.3 \pm 0.9\%$  after the ingestion of organic juice. The rapid and consistent increases on enzymatic activities in erythrocytes after grape juice intake in comparison to the control intervention suggest a polyphenol-induced modulation of enzymatic pathways *in vivo*. Remarkably, the augmented activities were not significantly different between conventional and organic juices.

### 3.3. Glycaemic status and uric acid levels

The variations on glycaemic status and uric acid levels after the control intervention and consumption of tropical juices are presented in Table 2.

During the intervention periods, there was no evidence or reports of adverse reactions due to the acute intake of *V. labrusca* L. grape juices and no abnormalities were observed in the routine biochemical parameters. The acute ingestion of conventional grape juice showed a higher impact on the glycaemic status of individuals, causing the highest variation in relation to baseline values. This was expected considering the higher concentration of assimilable carbohydrates (total sugars) in the conventional juice (Table 1).

Regarding the urate status, the highest variation on uric acid concentrations in the trial group was verified after intervention with the organic grape juice. However, variations to baseline were not significantly different among the interventions. More interestingly, the acute consumption of grape juices showed a non-significant effect on the glucose and uric acid concentrations. Considering the overall variations after each intervention, the effect of *V. labrusca* L. juices on these biochemical parameters were comparable to that of the control intervention with water.

Table 2. Variation on glucose and uric acid levels in healthy individuals at baseline and after interventions with tropical grape juices and control.

	Biochemical parameters ( $n=24$ )	
	Glucose ( $\text{mg dL}^{-1}$ )	Uric acid ( $\text{mg dL}^{-1}$ )
Tropical red grape juices		
<i>Conventional</i>		
Baseline	$75.8 \pm 6.8$	$3.2 \pm 1.6$
1 h after intervention (400 mL)	$78.3 \pm 6.9$	$3.2 \pm 1.6$
Variation to baseline (%)	$3.4^a \pm 0.5$	$1.2^a \pm 0.1$
<i>Organic</i>		
Baseline	$75.6 \pm 5.7$	$3.1 \pm 1.3$
1 h after intervention (400 mL)	$76.1 \pm 3.5$	$3.2 \pm 1.3$
Variation to baseline (%)	$0.6^a \pm 0.1$	$1.6^a \pm 0.8$
Control		
Baseline	$75.7 \pm 5.5$	$3.1 \pm 1.2$
1 h after intervention (400 mL)	$77.9 \pm 7.9$	$3.0 \pm 1.2$
Variation to baseline (%)	$2.9^a \pm 0.9$	$-2.9^a \pm 0.7$

Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. For each group, values represent the mean of three determinations for each subject analyzed with 15-day intervals.

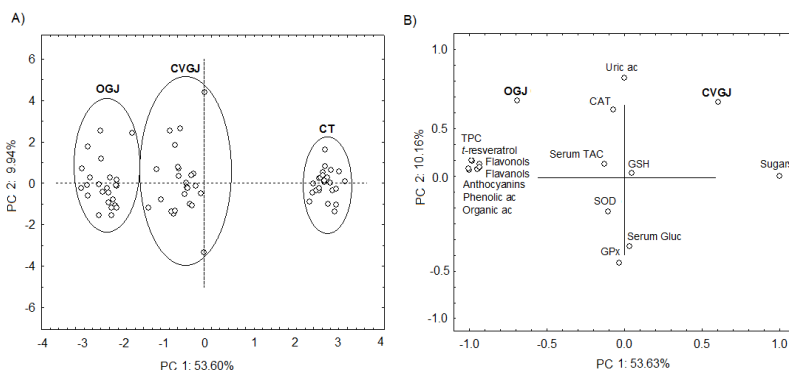
<sup>a,b</sup>Mean values of variation to baseline within a column with different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).

### 3.4. Influence of grape juice polyphenols on antioxidant responses

The influence of the main phenolic classes in *V. labrusca* L. juices on biological responses was assessed through PCA analysis (Fig. 4).

The sample score plot demonstrated a clearly separation of the intervention samples (Fig. 4A). The first principal component (PC1) explained 53.60% of the total variance while the second principal component (PC2) explained 9.94%. Based on the antioxidant responses, grape juices and control were located in opposite sides of the plot. More interestingly, the scores for organic and conventional grape juices were clearly separated in the dimensional plot. Further, another PCA was applied using only the data set obtained from grape juice interventions (Fig. 4B).

Fig. 4. Principal component analysis of antioxidant responses *in vivo* and phenolic composition of tropical grape juices. Panel (A): scores plot of samples in the plane defined by the first two principal components (PC); Panel (B): loading biplot of variable-factor in the first two principal components defined by grape juice factor. CAT = catalase; CT = control (water); CVGJ = conventional grape juice; GPx = glutathione peroxidase; GSH = reduced glutathione; OGJ = organic grape juice; Serum Gluc = glucose; SOD = superoxide dismutase; TAC = serum total antioxidant capacity; TPC = total phenolic content.



The PC1 explained 53.63% of the total variance, whereas PC2 accounted for 10.16%. In fact, PC1 allowed the distinction of organic juice from the conventional juice. From the loading of variables, the phenolic classes and total sugars in grape juices are the predominant parameters in PC1. Strong associations were verified for the antioxidant responses in PC2.

The PC1 was positively correlated with grape juice total sugars, GSH and serum glucose levels. PC2 was correlated with serum TAC, CAT, uric acid, organic acids and the main classes of polyphenols. In PC2, GSH, serum TAC and CAT were positively influenced by polyphenols.

Among all variables, the high association between polyphenols and antioxidants in plasma and serum corroborates that those are the main factors promoting the biological outcomes of interventions with tropical grape juices.

#### 4. Discussion

Several mechanistic studies report the biological properties of polyphenols. However, most of the studies are conducted using wines (*V. vinifera* L.), a mix of polyphenol-rich fruits or purified extracts from grape constituents. In this work, the antioxidant properties of tropical *V. labrusca* L. grape cultures, through the consumption of Isabel and Bordo grape juices, was verified in humans for the first time. The antioxidant defenses in the organism are responsible for the redox homeostasis, a physiological balance between oxidants and antioxidants, which is implicated in health conditions. After interventions, both organic and conventional red grape juices of Isabel and Bordo varieties improved antioxidant markers in healthy individuals. All individuals showed increased levels of GSH, serum TAC and erythrocyte enzymes in comparison to baseline values. In the organism, the redox-active molecule glutathione plays a crucial role in the antioxidant response [23]. The SOD enzyme exerts a potent free radical scavenging activity against excessive superoxide ions. Catalase converts hydrogen peroxide to hydrogen and oxygen at high catalytic rate. The activity of GPx is of reducing peroxides by converting GSH to oxidized glutathione (GSSG) and water [1]. Through the acute intervention trial, variations in these parameters allowed identifying immediate responses led by modulation of antioxidant defenses, suggesting that both nonenzymatic and enzymatic pathways can be affected by dietary intervention with *V. labrusca* L. juices.

Through the principal component analysis, the increases in serum TAC, GSH, CAT and uric acid were associated with many of phenolic classes, such as anthocyanins, flavonols, flavanols and the stilbene *trans*-resveratrol, which are potent antioxidants [13,14,24,25]. The serum TAC was significantly increased after grape juice ingestion. Importantly, the levels of uric acid were not significantly altered in serum of individuals, which confirms that the increased values of TAC were promoted by the antioxidants present in the grape juices. Considering the rapid effects verified on plasma parameters after juice intake, our results suggest that the increase on antioxidant markers was promoted by polyphenols, due to the capacity of phenolic compounds of modulating enzymatic and nonenzymatic pathways, thus, suppressing oxidative mechanisms. In comparison to the control intervention, the time point of 1 h post ingestion of tropical juices was sufficient to determine significant increases in serum TAC, GSH levels and enzymatic activities in erythrocytes. Previous studies [5,26] with



polyphenol-rich fruit juices have shown that peaks of serum antioxidant parameters occurs within 1 h after juice intake and the urinary excretion of phenolics is maximum after 2 h. Regarding the bioactivity of these compounds, in addition to scavenging of free radicals, polyphenols act on cellular redox by affecting mitochondrial respiration, by inducing gene expression and by chelating metals that modulate enzymatic activities [23,27], which corroborate the positive effects verified in this study.

The most relevant findings in our study corroborate that increases on antioxidant biomarkers are associated with polyphenols of *V. labrusca* L. juices, and that the improvement on redox homeostasis can be attributed to both conventional and organic grape juices. Further, despite the high concentration of sugars, the intake of tropical juices did not augment the glycaemic status and uric acid levels, suggesting that grape polyphenols positively affected glucose metabolism. These findings are particularly important since hyperglycaemia is involved in the development of diabetes mellitus and a restriction factor for the consumption of fruit juices by diabetic patients. Moreover, the glycaemic balance is intimately related to oxidative regulation at the cellular level. In the course of glucose oxidation, enediol-metal complexes are formed, leading to the formation of reactive superoxide anion upon reduction of molecular oxygen [28]. Hence, the augmented antioxidant capacity of plasma, GSH levels and enzymatic activity in erythrocytes associated with the glycaemic status of individuals verified 1 h after the ingestion of tropical juices, suggests a rapid effect of polyphenols on modulation of antioxidant biomarkers and glucose uptake. In fact, polyphenols from fruits and vegetables have been postulated to elicit health benefits through regulation of insulin sensitivity and modulation of glucose metabolism [29-31]. Remarkably, our results demonstrated that the antioxidant properties verified in humans after consumption of tropical *V. labrusca* L. juices are comparable to antioxidant effects associated with wine consumption [6,32-34].

Despite the higher concentration of polyphenols in the organic juice, results were not significantly different between the conventional and organic tropical juices, concerning their effect on antioxidant parameters. This suggests that the biological outcome of interventions with grape polyphenols is mainly related to the quality and complexity of phenolics present in a mixture or in a food matrix, and to a lesser

extent, to its phenolic content. Thus, the use of natural matrices or food products may represent a more reliable alternative in order to study polyphenols in nutritional and therapeutic approaches. Furthermore, for the *V. labrusca* L. juices used in this study, the chemical differences associated with cultivation systems were not a predictive factor regarding their bioactivity *in vivo*. Nevertheless, it is important to highlight that organic cultures are produced in a biological clean cycle, without the application of pesticides and bioengineered substances. On a relevant note, *V. labrusca* L. varieties are mainly employed for elaboration of grape juices, a natural and non-alcoholic beverage and an important grape derivative of viticulture.

In conclusion, the improvement of antioxidant defenses and the sustenance of glycaemic and urate statuses after consumption of grape juices of Isabel and Bordo varieties were demonstrated in humans, with no significant difference between organic and conventional juices. The randomized intervention trial allowed the determination of increased levels of GSH, serum TAC and enzymatic activities in erythrocytes after acute ingestion of tropical juices, with a clear distinction from the control (water), supporting the polyphenols-induced modulation of antioxidant responses. These represent the first evidence of the bioactivity of *V. labrusca* L. cultures through grape juice consumption with biological outcome on the redox homeostasis in humans. Notwithstanding, this pilot trial with health individuals provided initial evidence for further investigation on biological and therapeutic outcomes of *V. labrusca* L. juices in patient control groups.

### **Acknowledgments**

The authors gratefully acknowledge the Poggere Winery and M.Sc. Heloisa Pamplona Cunha for technical assistance. The authors are thankful to Dr. Daniel L. G. Borges and Dr. Jefferson Santos de Gois for contributions to the elemental analysis of grape juices. This work was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-Brazil).

### **Conflict of interest**

The authors have declared no conflict of interest.

## References

- [1] Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4th ed. Oxford: Oxford University Press; 2007.
- [2] Gu F, Chauhan V, Chauhan A. Impaired synthesis and antioxidant defense of glutathione in the cerebellum of autistic subjects: Alterations in the activities and protein expression of glutathione-related enzymes. *Free Radic Biol Med* 2013;65:488–96.
- [3] Pérez-Jiménez J, Serrano J, Taberero M, Arranz S, Díaz-Rubio ME, García-Diz L, Goñi I, Saura-Calixto F. Effects of grape antioxidant dietary fiber in cardiovascular disease risk factors. *Nutrition* 2008;24:646–53.
- [4] Feillet-Coudray C, Sutra T, Fouret G, Ramos J, Wrutniak-Cabello C, Cabello G, Cristol JP, Coudray C. Oxidative stress in rats fed a high-fat high-sucrose diet and preventive effect of polyphenols: Involvement of mitochondrial and NAD(P)H oxidase systems. *Free Radic Biol Med* 2009;46:624–32.
- [5] Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004;79:727–47.
- [6] Chiva-Blanch G, Urpi-Sarda M, Ros E, Valderas-Martinez P, Casas R, Arranz S, Guillén M, Lamuel-Raventós RM, Llorach R, Andres-Lacueva C, Estruch R. Effects of red wine polyphenols and alcohol on glucose metabolism and the lipid profile: A randomized clinical trial. *Clin Nutr* 2013;32:200–6.
- [7] Leifert WR, Abeywardena MY. Grape seed and red wine polyphenol extracts inhibit cellular cholesterol uptake, cell proliferation, and 5-lipoxygenase activity. *Nutr Res* 2008;28:842–50.
- [8] Simão F, Pagnussat AS, Seo JH, Navaratna D, Leung W, Lok J, Guo S, Waeber C, Salbego CG, Lo EH. Pro-angiogenic effects of resveratrol in brain endothelial cells: nitric oxide-mediated regulation of vascular

endothelial growth factor and metalloproteinases. *J Cereb Blood Flow Metab* 2012;32:884–95.

[9] Cicha I, Regler M, Urschel K, Goppelt-Struebe M, Daniel WG, Garlichs CDJ. Resveratrol inhibits monocytic cell chemotaxis to MCP-1 and prevents spontaneous endothelial cell migration through Rho kinase-dependent mechanism. *J Atheroscler Thromb* 2011;18:1031–42.

[10] Wang YH, Ge B, Yang XL, Zhai J, Yang LN, Wang X, Liu X, Shi JC, Wu YJ. Proanthocyanidins from grape seeds modulates the nuclear factor-kappa B signal transduction pathways in rats with TNBS-induced recurrent ulcerative colitis. *Int Immunopharmacol* 2011;11:1620–7.

[11] Wang Z, Chen Y, Labinskyy N, Hsieh T, Ungvari Z, Wu JM. Regulation of proliferation and gene expression in cultured human aortic smooth muscle cells by resveratrol and standardized grape extracts. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;346:367–76.

[12] Nixdorf SL, Hermosín-Gutiérrez I. Brazilian red wines made from the hybrid grape cultivar Isabel: Phenolic composition and antioxidant capacity. *Anal Chim Acta* 2010;659:208–15.

[13] Mulero J, Pardo F, Zafrilla P. Antioxidant activity and phenolic composition of organic and conventional grapes and wines. *J Food Compost Anal* 2010;23:569–74.

[14] Dani C, Oliboni LS, Pasquali MAB, Oliveira MR, Umezu FM, Salvador M, Moreira JCF, Henriques JAP. Intake of purple grape juice as a hepatoprotective agent in wistar rats. *J Med Food* 2008;11:127–32.

[15] Toaldo IM, Cruz FA, Alves TL, Gois JS, Borges DLG, Cunha HP, Silva EL, Bordignon-Luiz MT. 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 Chem* 2015;173:527–35.

[16] Beutler E, Kelly BM, Duron O. Improved method for determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* 1963;61:882–88.

- [17] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
- [18] Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984;105:121–6.
- [19] Boveris A, Fraga CG, Varsavsky AI, Koch OR. Increased chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rats. *Arch Biochem Biophys* 1983;227:534–41.
- [20] Wendel A. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1981;77:325–33.
- [21] Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP Assay. *Anal Biochem* 1996;239:70–6.
- [22] Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev* 2009;5:270–8.
- [23] Sandoval-Acuña C, Ferreira J, Speisky H. Polyphenols and mitochondria: An update on their increasingly emerging ROS-scavenging independent actions. *Arch Biochem Biophys* 2014;559:75–90.
- [24] Castilla P, Echarri R, Dávalos A, Cerrato F, Ortega H, Teruel JL, Lucas MF, Gomez-Coronado D, Ortuno J, Lasunción MA. Concentrated red grape juice exerts antioxidant, hypolipidemic, and antiinflammatory effects in both hemodialysis patients and healthy subjects. *Am J Clin Nutr* 2006;84:252–62.
- [25] Lima MS, Silani ISV, Toaldo IMT, Correa LC, Biasoto ACT, Pereira GD, Bordignon-Luiz MT, Ninow JL. Phenolic compounds, organic acids and antioxidant activity of grape juices produced from new Brazilian varieties planted in the Northeast Region of Brazil. *Food Chem* 2014;161:94–103.

[26] García-Alonso J, Rosa G, Vidal-Guevara L, Periago MJ. Acute intake of phenolic-rich juice improves antioxidant status in healthy subjects. *Nutr Res* 2006;26:330–9.

[27] Fernández-Iglesias A, Pajuelo D, Quesada H, Díaz S, Bladé C, Arola L, Salvadó MJ, Mulero M. Grape seed proanthocyanidin extract improves the hepatic glutathione metabolism in obese Zucker rats. *Mol Nutr Food Res* 2014;58:727–37.

[28] Negi G, Kumar A, Joshi RP, Sharma SS. Oxidative stress and Nrf2 in the pathophysiology of diabetic neuropathy: Old perspective with a new angle. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;408:1–5.

[29] Cheng DM, Pogrebnyak N, Kuhn P, Poulev A, Waterman C, Rojas-Silva P, Johnson WD, Raskin I. Polyphenol-rich Rutgers Scarlet Lettuce improves glucose metabolism and liver lipid accumulation in diet-induced obese C57BL/6 mice. *Nutrition* 2014;30:S52–S58.

[30] Serrano JCE, Gonzalo-Benito H, Jové M, Fourcade S, Cassanyé A, Boada J, Delgado MA, Espinel AE, Pamplona R, Portero-Otín M. Dietary intake of green tea polyphenols regulates insulin sensitivity with an increase in AMP-activated protein kinase  $\alpha$  content and changes in mitochondrial respiratory complexes. *Mol Nutr Food Res* 2013;57:459–70.

[31] Boaventura BCB, Di Pietro PF, Klein GA, Stefanuto A, Morais EC, Andrade F, Wazlawik E, Silva EL. Antioxidant potential of mate tea (*Ilex paraguariensis*) in type 2 diabetic mellitus and pre-diabetic individuals. *J Funct Food* 2013;5:1057–64.

[32] Gris EF, Mattivi F, Ferreira EA, Vrhovsek U, Filho DW, Pedrosa RC, Bordignon-Luiz MT. Phenolic profile and effect of regular consumption of Brazilian red wines on in vivo antioxidant activity. *J Food Compost Anal* 2013;31:31–40.

[33] Macedo LFL, Rogero MM, Guimarães JP, Granato D, Lobato LP, Castro IAC. Effect of red wines with different in vitro antioxidant activity on oxidative stress of high-fat diet rats. *Food Chem* 2013;137:122–9.

[34] Nogueir MA, Cerezo AB, Donoso Navarro E, Garcia-Parrilla MC. Intake of alcohol-free red wine modulates antioxidant enzyme activities in a human intervention study. *Pharm Res* 2012;65:609–14.





## CAPÍTULO 6

### **RESVERATROL MELHORA A DISFUNÇÃO ENDOTELIAL INDUZIDA POR TNF- $\alpha$ EM MODELO DE COCULTURA DE CÉLULAS INTESTINAIS CACO-2 E CÉLULAS ENDOTELIAIS HUMANAS**

Isabela Maia Toaldo<sup>1,2</sup>, John Van Camp<sup>2</sup>, Gerard Bryan Gonzales<sup>2</sup>,  
Senem Kamiloglu<sup>2</sup>, Marilde T. Bordignon-Luiz<sup>1</sup>, Charlotte Grootaert<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Admar Gonzaga 1346, 88034001 Florianópolis, Brasil.

<sup>2</sup>Department of Food Safety and Food Quality, Ghent University, Coupure Links 653, 9000 Gent, Belgium.



## Resumo

Estresse oxidativo e inflamação são associados à disfunção endotelial. O *trans*-resveratrol (RSV) é um polifenol presente em uvas e vinhos e apresenta propriedades bioativas. A fim de investigar o impacto de RSV e seus metabólitos em mecanismos cardiovasculares, foi empregado um modelo *in vitro* de cocultura de células intestinais e endoteliais, combinando os efeitos de absorção e conjugação com alterações na função endotelial. Células intestinais Caco-2 diferenciadas e células endoteliais humanas (EA.hy926) foram cultivadas em cocultura em sistema transwell. A bioatividade do RSV também foi avaliada através de um sistema sequencial, utilizando a fração transportada, e de um sistema padrão, utilizando o composto fenólico puro. Os efeitos do RSV na produção celular de óxido nítrico (NO), na inibição de espécies reativas de oxigênio (ERO) e secreção dos marcadores endoteliais: fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), interleucina-8 (IL-8) e molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) foram avaliados em células ativadas pelo fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e células não ativadas (condição não inflamatória). A análise da fração basolateral por UPLC-MS/MS<sup>E</sup> revelou a presença de RSV e quatro metabólitos conjugados, dois sulfatados e dois glucuronídeos, após o transporte em células Caco-2. A produção intracelular de ERO e a secreção de quimiocinas foram significativamente elevadas em células endoteliais ativadas por TNF- $\alpha$ . Na cocultura, o tratamento com RSV e seus metabólitos aumentou os níveis do agente vasodilatador NO e diminuiu significativamente os níveis de VEGF, ERO, IL-8 e ICAM-1 em ambas as condições inflamatória e não inflamatória. As propriedades bioativas do RSV demonstraram um efeito dose-dependente nos três sistemas avaliados. O tratamento com RSV e seus metabólitos demonstrou um efeito protetor contra o stress oxidativo e inflamação em células endoteliais e intestinais em cocultura. A bioatividade de RSV e seus metabólitos, bem como de outras moléculas de *crossstalk* não identificados neste estudo, pode ser responsável pelo potencial biológico associado ao *trans*-resveratrol, a partir da comunicação indireta entre diferentes células e tecidos humanos durante o processo de absorção *in vivo*.

**Palavras-chave:** cardiovascular, cocultura, ICAM-1, óxido nítrico, resveratrol.

## 1. Introdução

As doenças cardiovasculares compreendem a principal causa de morbidade e mortalidade no mundo ocidental e incluem uma série de condições patológicas relacionadas à disfunção de vasos sanguíneos, como artérias, veias e capilares [1]. A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica caracterizada pela formação de placas ateroscleróticas (ateromas) causadas por injúria endotelial e inflamação das paredes vasculares, que deflagram o acúmulo de moléculas lipídicas oxidadas, a infiltração de macrófagos, linfócitos e componentes do tecido conjuntivo e a proliferação de células musculares lisas [1, 2].

O estresse oxidativo e a inflamação no endotélio estão intimamente associados ao desenvolvimento da aterosclerose. Espécies reativas de oxigênio (ERO) atuam como potentes oxidantes de moléculas biológicas, como proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, causando disfunções em diversos mecanismos celulares. No endotélio, a ativação do fator de transcrição nuclear  $\kappa\beta$  (NF- $\kappa\beta$ ) e a liberação de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina (IL-1), interleucina 8 (IL-8) e interferon  $\gamma$  (IFN)- $\gamma$  aceleram a formação do ateroma [3,4]. Adicionalmente à inflamação, os pré-eventos associados à aterosclerose incluem disfunções metabólicas como as dislipidemias, hipertensão arterial, diabetes e obesidade, sendo que os fatores relacionados ao estilo de vida saudável, como dieta balanceada e atividades físicas, são importantes para supressão do estresse oxidativo e de condições inflamatórias [5,6].

O consumo de dietas ricas em polifenóis é associado à redução do risco de desenvolvimento de doenças crônico-degenerativas [7]. Derivados da uva como o suco e o vinho são bastante apreciados mundialmente e correspondem a importantes fontes de polifenóis na dieta humana [8]. O *trans-resveratrol* (*trans*-3,5,4'-trihydroxystilbene; RSV) é um importante estilbeno bioativo presente em uvas e vinhos, com propriedades biológicas relacionadas à saúde cardiovascular [9, 10]. Pesquisas *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado que o RSV tem ação na modulação da angiogênese [11, 12], da migração celular [13], de agentes vasodilatadores [14], da expressão de fatores inflamatórios e moléculas de adesão celulares [15, 16] e da transcrição gênica [17]. O composto é extensivamente metabolizado dando origem a derivados glucuronados e sulfatados durante as passagens intestinal e hepática [18]. Estudos demonstraram que esses metabólitos, especialmente os glucuronídeos, apresentam baixa bioatividade *in vitro* [18, 19].

Até o momento, estudos mecanísticos não têm incluído em seu design o metabolismo do fenólico RSV durante a absorção intestinal, e os mecanismos de comunicação ou “*crossstalk*” entre diferentes células ou tecidos são geralmente pospostos. Todavia, esses mecanismos são principalmente importantes uma vez que a interação entre o tecido epitelial intestinal e o endotélio envolve a ativação de vias de sinalização de respostas imunológicas e inflamatórias que, por sua vez, são moduladores-chave da disfunção endotelial [20, 21].

Neste trabalho, a aplicação de um modelo *in vitro* de cocultura de células epiteliais intestinais e endoteliais, combinando os efeitos de absorção com modificações na função endotelial em resposta ao RSV foi investigada. Marcadores de estresse oxidativo e a secreção de fatores endoteliais foram determinados em células endoteliais simulando condições inflamatórias induzidas por TNF- $\alpha$  e condições não inflamatórias. Além disso, alterações no metabolismo do RSV foram investigadas por cromatografia líquida de ultra eficiência com detecção por espectrometria de massas em *tandem* (UPLC-HDMS/MS<sup>E</sup>) e avaliadas quanto aos efeitos bioativos na cocultura e em sistemas sequencial e padrão.

## 2. Material e Métodos

### 2.1 Linhagens celulares e condições de cultivo

Os experimentos foram realizados utilizando a linhagem de células contínuas do adenocarcinoma de cólon humano (Caco-2) (HTB37<sup>TM</sup>) e a linhagem de células contínuas endoteliais humanas EA.hy926 (CRL2922<sup>TM</sup>) (American Type Culture Collection, Manassas, VA, EUA).

Células Caco-2 (passagens entre 15-27) e células endoteliais (passagens entre 9-15) foram cultivadas separadamente como culturas aderentes em frascos de cultura de tecidos de 25 cm<sup>2</sup> (Sarstedt, Essen, Bélgica) e cultivadas em meio de crescimento Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) contendo o indicador vermelho de fenol, glicose (5 g L<sup>-1</sup>) e suplementado com 10% aminoácidos não essenciais (glutamax<sup>TM</sup>), 10% (v/v) soro fetal bovino, penicilina (100 U mL<sup>-1</sup>) e estreptomicina (100 mg mL<sup>-1</sup>) (Gibco, Life Technologies, Bélgica). As células foram subcultivadas uma vez por semana com 0,25% (v/v) de tripsina-EDTA e cultivadas até 90% de confluência. O meio de cultura

foi descartado e renovado em dias alternados. As células foram incubadas a 37°C, 10% de CO<sub>2</sub> em atmosfera úmida saturada (Memmert GmbH & Co., Nuremberg, Alemanha).

## 2.2 Ensaio de viabilidade celular

Os experimentos para determinação da viabilidade celular foram realizados após o tratamento com *trans*-resveratrol (RSV, 99% de pureza) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) empregando o método MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio) (Sigma-Aldrich), conforme previamente descrito [22].

Células endoteliais e Caco-2 foram cultivadas separadamente em meio DMEM até 90% de confluência e subsequentemente semeadas em placas de 96 poços na concentração de 20.000 células por poço. Após 100% de confluência, as células foram tratadas com meio de exposição DMEM (sem vermelho de fenol) contendo RSV (1-100 µM) e incubadas a 37°C, 10% de CO<sub>2</sub>. O ensaio de MTT foi realizado após três dias de exposição em células diferenciadas Caco-2 e após dois dias de exposição em células endoteliais. Leituras de absorbância foram realizadas em leitor de microplacas Bio-Rad reader (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). Os resultados foram expressos em porcentagem de viabilidade celular em comparação às células não tratadas. As análises foram realizadas com seis réplicas biológicas.

## 2.3. Configuração experimental: cocultura e sistemas sequencial e padrão

Três configurações experimentais foram empregadas: (i) cocultura de células Caco-2 e células EA.hy926; (ii) sistema sequencial, em que as células Caco-2 e EA.hy926 foram cultivadas individualmente em placas separadas; (iii) sistema padrão, em que as células endoteliais foram cultivadas em monocultura e tratadas com soluções do padrão RSV.

(i) No modelo de cocultura, células Caco-2 foram semeadas no compartimento apical de placas Transwell com 12 poços (0,4 µm de diâmetro de poro, Elscolab, Kruibeke, Bélgica) a uma densidade celular de 250.000 células/poço e cultivadas em meio DMEM (5 g L<sup>-1</sup> de glicose, 10% (v/v) aminoácidos não essenciais, 10% (v/v) soro fetal bovino). Após a confluência e diferenciação celular por 15 dias, células EA.hy926 foram semeadas no compartimento basolateral da placa Transwell a uma densidade celular de 300.000 células/poço. As células

endoteliais foram cultivadas no sistema de cocultura até 100% de confluência, verificado no terceiro dia de cocultura. O meio de cultura foi renovado a cada dois dias. No quarto dia de cocultura, as células Caco-2 foram tratadas apicalmente com RSV nas concentrações de 5  $\mu\text{M}$  e 20  $\mu\text{M}$  em meio de exposição DMEM, sem vermelho de fenol e sem soro fetal bovino. O mesmo meio de exposição sem a adição de RSV foi aplicado no compartimento basolateral. Previamente ao tratamento com RSV, as células endoteliais no compartimento basolateral foram tratadas com  $\text{TNF-}\alpha$  10  $\text{ng mL}^{-1}$  em meio de exposição por 1 h de modo a induzir um alto grau de inflamação (condição inflamatória), associado às doenças cardiovasculares. A cocultura foi então incubada (37°C, 10%  $\text{CO}_2$ ) e amostras do meio de cultura da fração basolateral foram coletadas periodicamente, após 4 e 24 h, e imediatamente mantidas a 80 °C até as análises.

(ii) Adicionalmente, os mesmos procedimentos foram realizados empregando um modelo sequencial a fim de determinar os efeitos do RSV sobre as respostas celulares em um sistema isolado. No sistema sequencial, as células Caco-2 foram semeadas e cultivadas no compartimento apical de placas Transwell com 12 poços (0,4  $\mu\text{m}$  de diâmetro de poro, densidade celular de 250.000 células/poço) e as células endoteliais foram semeadas isoladamente em uma placa de 24 poços, a uma densidade celular de 100.000 células/poço. Após 15 dias de diferenciação, as células Caco-2 foram tratadas com RSV e as células endoteliais tratadas com  $\text{TNF-}\alpha$  conforme descrito anteriormente.

As células endoteliais foram então incubadas por 9 h (37°C, 10%  $\text{CO}_2$ ) com a fração basolateral (transportada) coletada nos tempos de 4 e 24 h após o tratamento das células Caco-2 com RSV (5  $\mu\text{M}$  e 20  $\mu\text{M}$ ). (iii) No sistema padrão, as células endoteliais foram pré-tratadas com  $\text{TNF-}\alpha$  conforme descrito e então submetidas ao tratamento com soluções do padrão RSV nas concentrações de 5  $\mu\text{M}$  e 20  $\mu\text{M}$  em meio de exposição, e incubadas por 9 h (37°C, 10%  $\text{CO}_2$ ). Em todas as configurações experimentais, os experimentos foram repetidos simulando a condição controle não inflamatória, a partir de células endoteliais não tratadas com  $\text{TNF-}\alpha$ .

#### 2.4. Testes de permeabilidade celular e resistência elétrica transepitelial (TEER)

Para os ensaios de transporte celular, o coeficiente de permeabilidade aparente ( $P_{app}$ ) da monocamada de células Caco-2 foi monitorado antes e após os experimentos empregando o reagente fluorogênico amarelo de lúcer (Sigma-Aldrich, Diegem, Bélgica) como um marcador indicativo de difusão paracellular passiva [23]. Adicionalmente, a integridade da monocamada de células epiteliais intestinais foi monitorada antes e após os experimentos a partir de determinações da resistência elétrica transepitelial (TEER) (REMS system, World Precision Instruments, Hertfordshire, Reino Unido). Apenas monocamadas de células Caco-2 com valores de TEER entre 900 e 1.100  $\Omega \text{ cm}^2$  foram utilizadas.

#### 2.5. Análises por UPLC-HDMS/MS<sup>E</sup>

Amostras de meio de cultura da fração basolateral foram analisadas por UPLC-HDMS/MS<sup>E</sup> para detecção de metabólitos de RSV após o metabolismo por células Caco-2. As análises por foram realizadas em cromatógrafo Waters Acquity UPLC system (Waters Corp., Milford, MA, EUA) acoplado ao espectrômetro de massas Synapt HDMS TOF (Waters Corp.) com fonte de ionização por eletrospray.

A separação cromatográfica foi realizada em coluna de fase reversa Waters Acquity BEHC18 (2,1 mm  $\times$  150 mm, 1,7 m de diâmetro de partícula interna) empregando o modo de eluição gradiente com fase móvel composta por: (A) água ultrapura 0.1% (v/v) ácido fórmico e (B) metanol 0.1% (v/v) ácido fórmico, conforme previamente descrito [24]. Os dados analíticos foram adquiridos no modo de ionização negativa contínuo e as energias de colisão mínima e máximas foram programadas em 6 V e 45 V, respectivamente. As massas foram determinadas na faixa entre 100 e 1500 Da com velocidade de monitoramento de 0,2 s empregando os softwares MassLynx software 4.1 e Metabolynx<sup>TM</sup> (Waters Corp.) para a detecção dos picos cromatográficos e identificação de metabólitos das fases I e II.

#### 2.6. Determinação de espécies reativas de oxigênio (ERO)

Níveis intracelulares de ERO foram determinados em células endoteliais na cocultura e nos sistemas sequencial e padrão tratados com RSV através da reação com a sonda fluorogênica H<sub>2</sub>-DCFDA (2,7-



diacetato diclorodihidrofluoresceína) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). No método, o reagente não fluorogênico é convertido por desacetilases intracelulares para DCFH, que mediante oxidação por ERO é convertido no composto altamente fluorescente 2,7'-diclorofluoresceína (DCF) [25]. Após os ensaios de transporte e tratamento com a fração basolateral ou solução padrão de RSV, as células endoteliais foram tratadas com H<sub>2</sub>-DCFDA 20 µM em meio DMEM e incubadas por 30 min (37°C, 10% CO<sub>2</sub>). As células foram então lavadas com tampão fosfato salino e expostas por 30 min à água ultrapura 10% etanol (v/v) gelada para a lise celular. Em seguida, as células foram coletadas das placas através de raspagem com ponteira e cuidadosamente transferidas em suspensão para tubos eppendorf e centrifugadas a 14.000 rpm durante 10 min. A fluorescência dos sobrenadantes foi lida imediatamente ( $\lambda_{\text{ex/em}} = 485/535$  nm) em espectrofotômetro de fluorescência com leitor de microplacas Spectramax (Molecular Devices, CA, EUA).

### *2.7. Determinação da produção endotelial de óxido nítrico (NO)*

A produção de óxido nítrico em células endoteliais foi monitorada utilizando o ensaio colorimétrico de Griess (Sigma-Aldrich, MO, EUA), conforme previamente descrito [11]. Concentrações de nitrito (NO<sub>2</sub>) foram quantificadas através de curva padrão utilizando nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>) em seis concentrações, com faixa linear entre 0 e 20 µM.

Para as três configurações experimentais, amostras de meio de cultura foram coletadas e imediatamente misturadas em igual volume do reagente de Griess. Após 15 min à temperatura ambiente (18 °C), a absorbância da solução foi lida a 540 nm em espectrofotômetro Bio-Rad reader.

### *2.8. Ensaios imunoenzimáticos (ELISA)*

A secreção de IL-8, VEGF e ICAM-1 na cocultura foi monitorada em amostras de meio de cultura da fração basolateral coletadas nos tempos de 4 h e 24 h após o tratamento com RSV, utilizando os kits enzimáticos ELISA TMB IL-8 humano, TMB VEGF humano e ABTS ICAM-1 (Peprotech, Rocky Hill, NJ, EUA), respectivamente, de acordo com as instruções do fabricante.

## 2.9. Análise estatística

Os dados foram analisados empregando a Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste t de Student para análise de diferenças estatísticas (Statistica 7,0 203, Inc. StatSoft, Tulsa, EUA). A significância foi considerada em  $p < 0,05$  e  $p < 0,001$ . Os resultados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Todos os experimentos de cocultura, sequenciais e padrão foram realizados com três placas de cultura semeadas em três momentos diferentes no decurso de quatro meses, referidas como réplicas biológicas, de modo a suprimir efeitos de intervariabilidade. Para cada repetição biológica, três poços de uma mesma placa, referidos como repetições analíticas, compreenderam as triplicatas das análises.

## 3. Resultados

### 3.1. Identificação dos metabólitos transportados

Em experimentos preliminares, o transporte e metabolismo do RSV em células Caco-2 foram analisados em amostras da fração basolateral coletadas periodicamente entre 0 e 24 h. Após 2 h de exposição a 100  $\mu\text{M}$  de RSV, a presença do estilbeno intacto e de um metabólito hidrofílico foi detectado no cromatograma. Na sequência, RSV e outros dois metabólitos foram detectados após 24 h de exposição (dados não mostrados). Dessa forma, o tempo de 24 h de exposição foi selecionado como condição ótima para a identificação dos metabólitos de RSV por UPLC-MS/MS<sup>E</sup>.

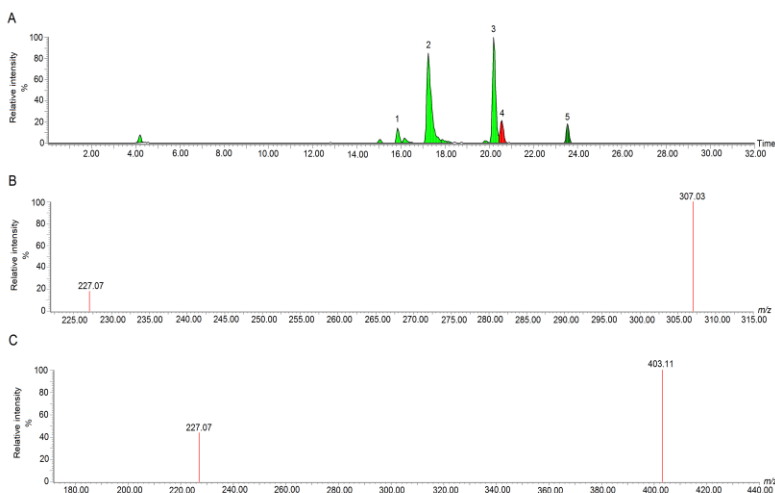
Quatro metabólitos conjugados foram identificados, compreendendo dois sulfatos e dois glucuronídeos derivados do RSV (Tabela 1). A Figura 1 mostra o cromatograma total de íons e o espectro de massas de uma amostra de meio de cultura coletada após 24 h de incubação e transporte em células Caco-2 tratadas com 20  $\mu\text{M}$  de RSV.

Tabela 1. Modificações do RSV e metabólitos identificados por UPLC-MS/MS<sup>E</sup> após metabolismo e transporte em células Caco-2.

Compostos identificados	Fórmula molecular	TR (min)	Massa molecular	<i>m/z</i> detectada	Fragmento MS/MS	Perda neutra	Modificação
(1) <i>Trans</i> -Resveratrol-4'- <i>O</i> - $\beta$ -glucuronídeo	C20H20O9	15,85	404,11	403,11	227,07	176	Glucuronidação
(2) <i>Trans</i> -Resveratrol-4'-sulfato	C14H12O6S	17,23	308,04	307,03	227,07	80	Sulfatação
(3) <i>Trans</i> -Resveratrol-3-sulfato	C14H12O6S	20,19	308,04	307,03	227,07	80	Sulfatação
(4) <i>Trans</i> -Resveratrol-3- <i>O</i> - $\beta$ -glucuronídeo	C20H20O9	20,58	404,11	403,11	227,07	176	Glucuronidação
(5) <i>Trans</i> -Resveratrol	C14H12O3	23,53	228,07	227,07	-	0	-

TR = tempo de retenção.

Fig. 1. Cromatograma e espectro de massas da fração basolateral após transporte em células Caco-2. Cromatograma total de íons (A); 1 = *trans*-resveratrol-4'-*O*- $\beta$ -glucuronídeo, 2 = *trans*-resveratrol-4'-sulfato, 3 = *trans*-resveratrol-3-sulfato, 4 = *trans*-resveratrol-3-*O*- $\beta$ -glucuronídeo, 5 = *trans*-resveratrol. Transições  $m/z$ : RSV  $m/z$  227,07 e seus metabólitos, sulfato  $m/z$  307,03 (B) e glucuronídeo  $m/z$  403,11 (C).



Os dados coletados por MS/MS para o íon precursor RSV e íons-produto mostram os picos de RSV e de seus principais metabólitos conjugados, confirmados com base na massa precisa da transição  $m/z$  e no tempo de retenção (TR, min): *trans*-resveratrol (TR = 23,53), *trans*-resveratrol-4'-*O*- $\beta$ -glucuronídeo (TR = 15,85), *trans*-resveratrol-4'-sulfato (TR = 17,23), *trans*-resveratrol-3-sulfato (TR = 20,19) e *trans*-resveratrol-3-*O*- $\beta$ -glucuronídeo (TR = 20,58).

Apesar de menos abundante, a presença do pico de RSV no cromatograma de íons revelou que, não somente seus derivados conjugados, mas o polifenol em sua forma intacta é transportado por células Caco-2. Seus metabólitos, de maior hidrofilicidade, produziram picos bem separados e definidos, com tempos de retenção na faixa de 15,0 a 21,0 min, e com maior intensidade para os conjugados sulfatados.

O espectro de massas permitiu a detecção seletiva da transição  $m/z$  dos metabólitos, confirmando a maior intensidade dos derivados glucuronado- e sulfato- conjugados em relação ao composto precursor. Além disso, a superior abundância relativa das formas sulfatadas ( $m/z$  =

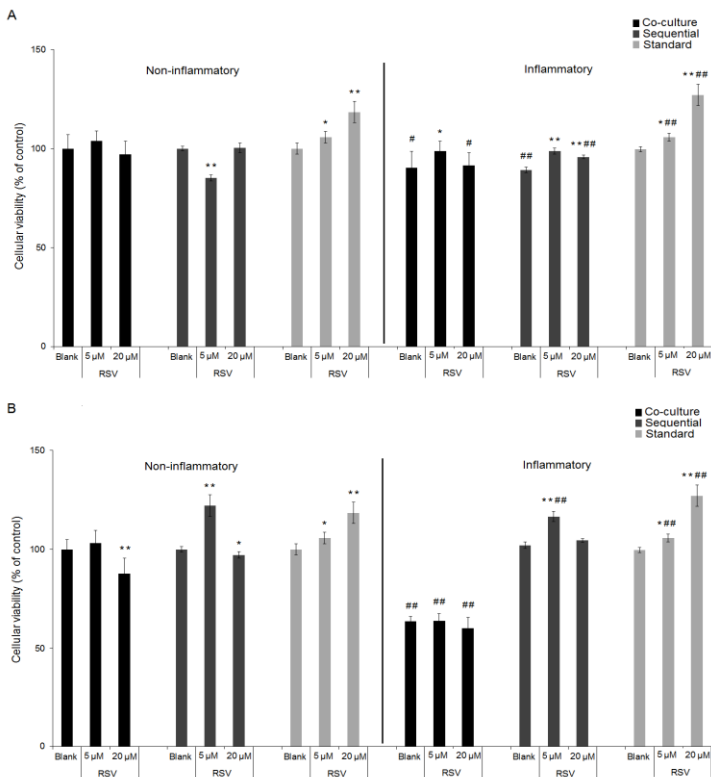
307,03) em comparação ao íon precursor e aos íons de glucuronídeos revelou que os sulfatos compreendem os principais metabólitos formados durante o metabolismo do RSV em células Caco-2.

### 3.2. Desenvolvimento da cocultura e efeito do RSV sobre a atividade mitocondrial celular

A fim de desenvolver um modelo *in vitro* combinando a absorção de polifenóis com os efeitos sobre um tecido alvo, células Caco-2 diferenciadas foram cultivadas em cocultura com células endoteliais EA.hy926 e alterações na permeabilidade e metabolismo celular em resposta ao RSV foram monitoradas através da atividade mitocondrial de células endoteliais ativadas por TNF- $\alpha$  (condição inflamatória) e não ativadas (condição não inflamatória). Em relação à permeabilidade da monocamada de células intestinais, os valores de  $P_{app}$  relativos à direção de fluxo da fração apical à fração basolateral variaram de  $4,61 \pm 0,25 \times 10^{-5} \text{ cm s}^{-1}$  no sistema sequencial, composto apenas por células Caco-2, a  $4,80 \pm 0,23 \times 10^{-5} \text{ cm s}^{-1}$  na cocultura, composta por células Caco-2 e células endoteliais nos compartimentos apical e basolateral, respectivamente.

Os valores de TEER variaram de  $944,44 \pm 28,03 \Omega \text{ cm}^2$  no sistema sequencial a  $1.034,79 \pm 43,91 \Omega \text{ cm}^2$  na cocultura. As variáveis de integridade e permeabilidade da monocamada de células Caco-2 foram negativamente correlacionadas e não demonstraram diferença significativa entre os dois sistemas ( $p < 0.05$ ). Dessa forma, foi verificado que a cocultura de células Caco-2 e EA.hy926, bem como os tratamentos com TNF- $\alpha$  e RSV, não afetou negativamente o modelo da barreira intestinal de células Caco-2. Contrariamente, as alterações na atividade mitocondrial em resposta ao RSV foram fortemente afetadas pelo método de cultivo, com respostas distintas observadas na cocultura, quando comparadas a dos sistemas sequencial e padrão (Fig. 2).

Fig. 2. Atividade mitocondrial de células endoteliais em resposta ao RSV após 4 h (A) e 24 h (B) em cocultura e nos sistemas sequencial e padrão nas condições inflamatória induzida por TNF- $\alpha$  e não inflamatória. Os resultados são expressos em porcentagem do controle (*blank*) da condição não inflamatória, não tratada com TNF- $\alpha$  ou RSV.



Os dados representam a média  $\pm$  erro padrão, de três medições em triplicata, de seis experimentos independentes. \* e \*\* indicam diferença significativa ( $p < 0,05$  e  $p < 0,001$ , respectivamente) em comparação com a respectiva amostra controle não tratada com RSV; # e ## indicam diferença significativa ( $p < 0,05$  e  $p < 0,001$ , respectivamente) em comparação com a respectiva amostra controle não tratada com TNF- $\alpha$ .

Uma primeira observação importante demonstra que somente na cocultura após 24h de incubação a atividade mitocondrial de células endoteliais ativadas por TNF- $\alpha$  foi significativamente reduzida em 35% em comparação às células não ativadas, independentemente da concentração de RSV. Este efeito não foi verificado no sistema

sequencial, em que apenas as células endoteliais receberam o tratamento com TNF- $\alpha$ . Dessa forma, pode-se inferir que, em resposta à exposição ao TNF- $\alpha$  e sem efeito do RSV, as células Caco-2 secretam citocinas capazes de danificar o endotélio após 24 h. Adicionalmente, foi verificado que em condições de monocultura no sistema padrão o tratamento com RSV aumentou a atividade mitocondrial através de um mecanismo dose-dependente. O mesmo efeito não foi observado na cocultura e no sistema sequencial. Isto pode representar uma primeira indicação de que o RSV em sua forma nativa intacta, ao contrário de seus metabólitos transportados, induz a função mitocondrial *in vitro*. De forma geral, os efeitos do fenólico RSV nas diferentes concentrações avaliadas sobre a cocultura e o sistema sequencial após 4 e 24 h de exposição foram similares. Mais especificamente, o tratamento com RSV 5  $\mu$ M promoveu um pequeno aumento na reatividade celular, enquanto que uma diminuição neste parâmetro foi verificada com RSV 20  $\mu$ M. Essa observação sugere que a indução de vias celulares causada pelo RSV é, portanto, dose-dependente.

### 3.3. Produção de NO

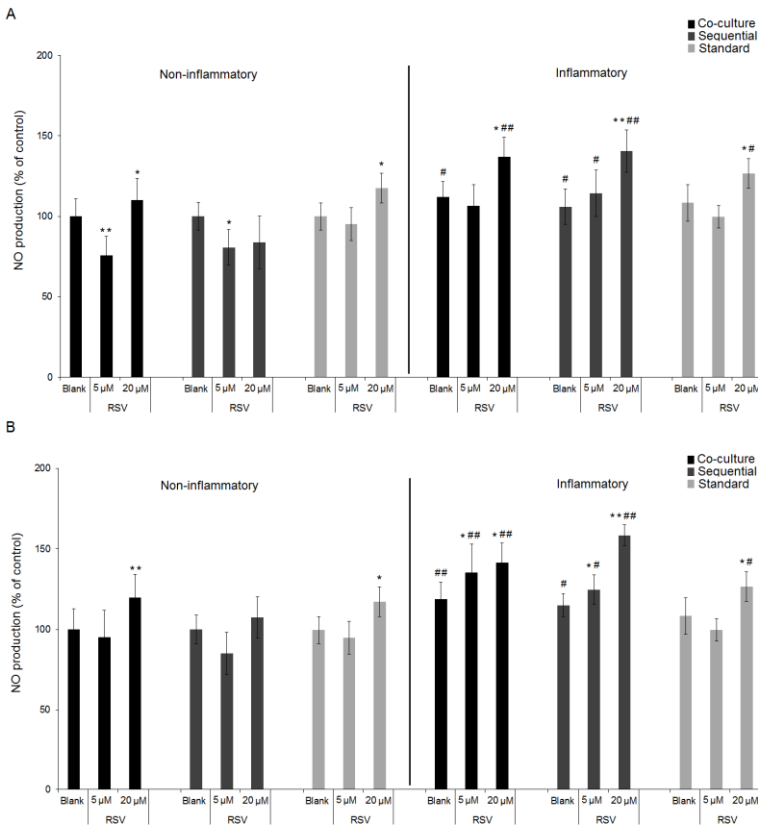
O efeito do RSV e metabólitos na produção celular de NO é apresentado na Fig. 3. Em relação ao sistema padrão, os resultados da Fig. 3 mostram que o pré-tratamento com TNF- $\alpha$  por 1 h resultou em níveis de NO significativamente superiores na cocultura e no sistema sequencial, especialmente no tempo de 24 h. Interessantemente, este efeito não foi verificado no sistema padrão. Além disso, foi observado que neste sistema e na cocultura o tratamento com RSV 20  $\mu$ M aumentou significativamente a produção de NO após 4 h e 24 h de exposição, em ambas as condições inflamatória e não inflamatória. Essa observação é consistente com dados previamente descritos para sistemas de monocultura [11, 16].

Contrariamente, em concentrações mais baixas de RSV (5  $\mu$ M), a produção de NO foi significativamente reduzida em 4 h e ligeiramente reduzida em 24 h em células endoteliais não tratadas com TNF- $\alpha$ .

Observou-se ainda que, especialmente em células ativadas por TNF- $\alpha$ , a exposição ao RSV acarretou uma produção extra de óxido nítrico endotelial somente na cocultura e no sistema sequencial, sob um efeito dose-dependente. Isto indica que a fração transportada contendo RSV e seus metabólitos, ao invés do fenólico isoladamente, aumentou a

produção do agente vasodilatador em células endoteliais; ou que o agente é também produzido por células Caco-2 em reposta ao RSV, ou ambos.

Fig. 3. Produção de NO em células endoteliais após 4 h (A) e 24 h (B) de exposição ao RSV e metabólitos, nas condições inflamatória induzida por TNF- $\alpha$  e não inflamatória. Os resultados são expressos em porcentagem do controle da condição não inflamatória.



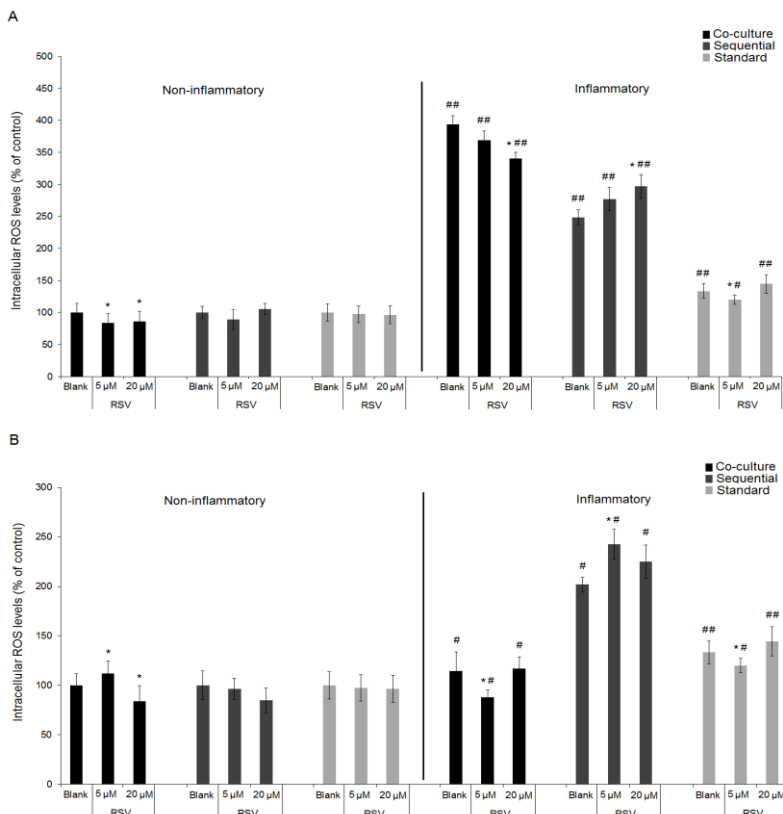
Os dados representam a média  $\pm$  erro padrão. \* e \*\* diferença significativa ( $p < 0,05$  e  $p < 0,001$ , respectivamente) em comparação com a respectiva amostra controle não tratada com RSV; # e ## diferença significativa ( $p < 0,05$  e  $p < 0,001$ , respectivamente) em comparação com a respectiva amostra controle não tratada com TNF- $\alpha$ .



### 3.4. RSV e metabólitos inibem o estresse oxidativo na cocultura e no sistema sequencial

Os efeitos sobre a inibição de ERO são apresentados na Fig. 4.

Fig. 4. Níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio em células endoteliais em resposta ao RSV e metabólitos após 4 h (A) e 24 h (B).



Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão, de três experimentos independentes, em triplicatas. \* e \*\* indicam diferença significativa ( $p < 0,05$  e  $p < 0,001$ , respectivamente) em comparação com a respectiva amostra controle não tratada com RSV; # e ## indicam diferença significativa ( $p < 0,05$  e  $p < 0,001$ , respectivamente) em comparação com a respectiva amostra controle não tratada com TNF- $\alpha$ .

A ativação das células endoteliais com TNF- $\alpha$  resultou em um grande aumento dos níveis intracelulares de ERO em todas as configurações experimentais avaliadas, atingindo concentrações 4 vezes superiores aos valores basais na cocultura, no tempo de 4 h (Fig. 4). Essa observação é consistente com dados da literatura [21]. Por outro lado, quando as células foram pré-tratadas com TNF- $\alpha$ , o aumento dos níveis de ERO foi fortemente dependente da configuração experimental. A resposta mais rápida foi observada na cocultura, em que as concentrações de ERO após 4 h foram significativamente superiores às concentrações no tempo de 24 h. O mesmo efeito, embora com menor intensidade, foi observado no sistema sequencial, enquanto que no sistema padrão as variações mostraram-se mais limitadas.

Considerando os resultados de viabilidade celular e as variações verificadas nos níveis de ERO, é provável que a forte e rápida resposta oxidativa observada na cocultura de células endoteliais estimuladas com TNF- $\alpha$  tenha levado a uma injúria endotelial permanente após 24 h de incubação, possivelmente causada também por fatores secretados pelas células Caco-2. O efeito de RSV sobre os níveis de ERO mostrou-se, portanto, dependente tanto do tratamento com TNF- $\alpha$  quanto da configuração experimental empregada. Contudo, na condição não inflamatória, o efeito de RSV foi apenas significativo no modelo de cocultura.

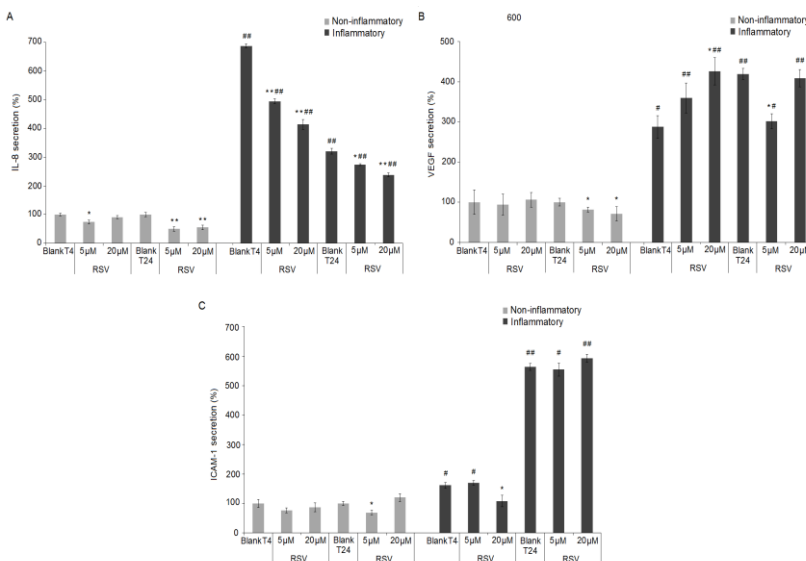
Com a exposição a RSV 5  $\mu$ M, os níveis intracelulares de ERO foram reduzidos significativamente após 4 h de incubação, apresentando um aumento tardio após 24 h. Com RSV 20  $\mu$ M, os níveis desses oxidantes nas células endoteliais foram consistentemente reduzidos até 24 h de incubação no modelo de cocultura. Sob condições inflamatórias, o tratamento com o fenólico promoveu uma diminuição gradativa e dose-dependente dos níveis de ERO na cocultura após 4 h de exposição ao composto e seus metabólitos.

No sistema sequencial, um efeito inverso foi observado, com um aumento significativo das concentrações de ERO para o tratamento com RSV 20  $\mu$ M. Já na cocultura após 24 h, o efeito dose-dependente foi menos pronunciado, sendo verificada uma redução significativa nos níveis de oxidantes em células tratadas com RSV 5  $\mu$ M. Estes resultados evidenciaram que a adição de RSV no modelo de cocultura foi capaz de inibir o estresse oxidativo induzido por TNF- $\alpha$  e citocinas produzidas por células Caco-2 em células endoteliais.

### 3.5. Efeito do RSV sobre marcadores inflamatórios na cocultura

A secreção de marcadores pró-inflamatórios foi testada em células endoteliais ativadas por TNF- $\alpha$  e células não ativadas, a fim de determinar os efeitos do RSV e seus metabólitos sobre as respostas do endotélio em condições inflamatórias e não inflamatórias, respectivamente. Considerando os resultados dos parâmetros oxidativos, o modelo de cocultura foi selecionado para determinar a secreção de VEGF, ICAM-1 e IL-8 após o metabolismo do RSV (Fig. 5).

Fig. 5. Secreção de quimiocinas pró-inflamatórias e do fator de crescimento endotelial vascular na cocultura de células Caco-2 e EA.hy926 durante exposição ao RSV e metabólitos. A) IL-8; B) VEGF; C) ICAM-1.



Os resultados são representados em porcentagem do controle da condição não inflamatória e representam a média  $\pm$  erro padrão, de três medições em triplicata, de três experimentos independentes. \* e \*\* indicam diferença significativa ( $p < 0,05$  e  $p < 0,001$ , respectivamente) em comparação com a respectiva amostra controle não tratada com RSV; # e ## indicam diferença significativa ( $p < 0,05$  e  $p < 0,001$ , respectivamente) em comparação com a respectiva amostra controle não tratada com TNF- $\alpha$ .

Em células ativadas por TNF- $\alpha$ , a secreção desses marcadores foi significativamente superior em comparação aos valores basais da condição não inflamatória, com aumentos de 1,5 e 7 vezes nas concentrações de ICAM-1 e IL-8, respectivamente. Na condição normal não inflamatória, foram verificadas reduções significativas e dose-dependentes nas concentrações de IL-8 para as células tratadas com RSV, especialmente após 24 h de incubação. De maneira similar, a secreção de IL-8 diminuiu consistentemente com a exposição ao RSV e metabólitos após 4 h e 24 h. Além disso, na condição normal, o tratamento com RSV reduziu a secreção de VEGF após 24 h de incubação, a partir de um efeito dose-dependente. Contrariamente, nas células tratadas com TNF- $\alpha$  foi observado um aumento dos níveis de VEGF após 4 h de exposição ao RSV. Após 24 h, o mesmo efeito foi menos evidente.

Conforme mostra a Fig. 5, a secreção de ICAM-1 aumentou significativamente após a estimulação celular com TNF- $\alpha$ . Interessantemente, o aumento na concentração de ICAM-1 foi de aproximadamente 6 vezes após 24 h de incubação, o que corresponde ao tempo em que foi verificada uma redução significativa na viabilidade das células endoteliais. Com relação à exposição ao RSV, embora algumas condições tenham demonstrado efeito do fenólico sobre a secreção de moléculas de adesão, não foi observada uma clara correlação dose-efeito.

#### 4. Discussão

Este estudo avaliou o impacto do *trans*-resveratrol e seus metabólitos sobre marcadores-chave de viabilidade celular, do estresse oxidativo e de inflamação, associados à disfunção endotelial, através de uma configuração experimental de cultura de células que permitiu o metabolismo intestinal e a comunicação entre células intestinais e endoteliais. Apesar de um modelo de cocultura semelhante ter sido desenvolvido recentemente [21], este trabalho apresenta um estudo mais aprofundado sobre o modelo *in vitro* de cocultura de células Caco-2 e células endoteliais EA.hy926, em comparação com os modelos sequenciais e de monoculturas utilizados convencionalmente. Além disso, as principais diferenças entre o modelo publicado anteriormente e o modelo apresentado neste trabalho são: (i) as linhagens celulares empregadas para a cocultura, (ii) alguns dos parâmetros biológicos, (iii) a utilização do fenólico RSV ao invés de um extrato de antocianinas, e (iv) uma análise detalhada dos metabólitos de RSV que foram

efetivamente transportados por células Caco-2, atingindo o compartimento basolateral contendo células endoteliais.

Comparando-se a configuração experimental de cocultura com os sistemas sequencial e padrão avaliados, evidências de comunicação celular ou “*crossstalk*” podem ser obtidas dos resultados. Alterações nos níveis de ERO e NO na cocultura demonstraram um claro efeito de comunicação entre as linhagens celulares. Após a indução de inflamação com TNF- $\alpha$ , os consistentes decaimentos na viabilidade celular e nos níveis intracelulares de ERO indicaram danos das células endoteliais devido a mecanismos oxidativos e ao metabolismo combinado na cocultura. Estes mecanismos foram afetados, mas não completamente suprimidos após exposição ao RSV e seus derivados conjugados.

Em relação ao modelo de cocultura desenvolvido, algumas respostas biológicas foram coincidentes com as reportadas anteriormente [21]. Por exemplo, o fator TNF- $\alpha$  exerceu um forte efeito indutivo sobre a secreção da molécula de adesão ICAM-1 e de quimiocinas pró-inflamatórias na cocultura. Além disso, este efeito foi mais pronunciado após a incubação por um longo período (24 h). Com relação ao RSV, os efeitos do polifenol sobre a secreção de VEGF, IL-8 e ICAM-1 na cocultura foram avaliados em células ativadas por TNF- $\alpha$  e em células não ativadas. De fato, estímulos diversos que afetam a regulação celular de NO e a formação de ERO podem levar à expressão de moléculas pró-inflamatórias no endotélio [26].

Como esperado, a secreção do fator de crescimento endotelial, da citocina IL-8 e da molécula de adesão intercelular foi consideravelmente aumentada após a indução de inflamação pelo TNF- $\alpha$ . É postulado que esse fator modula a expressão de mais de 4.000 genes em células endoteliais, principalmente relacionados a proteínas de adesão celular, inflamatórias e de quimiotaxia [27]. A partir dos resultados observou-se que, devido à exposição ao TNF- $\alpha$ , os níveis de VEGF, NO e ERO aumentaram significativamente na cocultura. Este efeito pode ser explicado pela ativação do receptor mitocondrial Romo1, desencadeando a formação de ERO; e pela regulação positiva da síntese de VEGF nas células endoteliais, o que causa a estimulação do receptor de tirosina-quinase VEGFR/Flt (KDR) envolvido na fosforilação da eNOS e na ativação do óxido nítrico endotelial [28,29].

O aumento dos níveis de IL-8 e de moléculas de adesão verificado na cocultura sugere a ativação da transcrição de IL-8 e ICAM-1 dependente do fator NF- $\kappa\beta$ , induzido pelo tratamento com

TNF- $\alpha$  [30,31]. Apesar do efeito significativo do RSV e seus metabólitos na redução da secreção de moléculas pró-inflamatórias na cocultura, as diminuições das concentrações de ICAM-1, VEGF e IL-8 em relação ao controle foram mais evidentes nas células ativadas por TNF- $\alpha$ . Isso sugere que o RSV e os seus conjugados atuam por meio de uma regulação inibitória da cascata inflamatória nas células endoteliais, sendo capaz de manter um efeito mais sustentado sob condições de inflamação pré-existentes.

Em comparação às células HUVEC em cocultura [21], a linhagem de células EA.hy926 utilizada neste estudo tem a vantagem de constituir-se de células imortalizadas com características endoteliais, e por conseguinte, apresenta condições de cultivo facilitadas, sem perda de crescimento e função ao longo do tempo. No entanto, esta linhagem é produto da fusão de células da veia umbilical primárias com a linhagem de células de carcinoma de pulmão A549, e, portanto, é relevante ressaltar que algumas das respostas biológicas podem incorrer de sua origem cancerígena. Não obstante, o sistema de cocultura empregado tem o potencial de mimetizar as condições *in vivo*, uma vez que: (i) representa a proximidade de tecidos numa configuração de contato indireto entre as células apicais e basais, mimetizando as células epiteliais do intestino e as dos tecidos-alvo; (ii) a monocamada de células Caco-2 no compartimento apical simula a barreira intestinal como primeira linha de contato do lúmen intestinal, a fim de absorver os compostos da dieta; (iii) permite a comunicação direta entre as diferentes linhagens celulares, que é afetada por mediadores solúveis secretados por ambos os tipos de células [20]. Dessa forma, corrobora-se que o modelo é capaz de mimetizar o impacto de compostos bioativos absorvidos sobre o endotélio.

Em relação às respostas biológicas, foram estudados importantes parâmetros de estresse oxidativo e inflamação. No sistema *in vivo*, estes mecanismos incorrem quando há um desequilíbrio entre mediadores de oxidação e defesas antioxidantes [3,26]. O polifenol resveratrol tem demonstrado seu potencial benéfico em suprimir tais mecanismos [9,10,28]. Neste estudo, os resultados demonstraram que o RSV é capaz de influenciar significativamente a produção de NO em nível celular, em ambas as condições normal e inflamatória. De fato, evidências comprovam que o RSV induz positivamente a atividade da enzima eNOS e a liberação de NO no endotélio [32]. Este composto fenólico promove a ativação de NO através da estimulação da fosforilação da proteína quinase B e da fosfoproteína estimulada por vasodilatador (VASP) [14]. No entanto, seus derivados sulfatados e

glucuronídeos não foram capazes de induzir a produção de NO em células endoteliais [33]. Marcantemente, os resultados mostraram que os níveis de ERO apenas foram reduzidos significativamente na cocultura, após o metabolismo do RSV por células Caco-2.

Durante o processo de absorção, o resveratrol sofre intenso metabolismo por células epiteliais do intestino [34]. Assim, apenas concentrações muito baixas de RSV não conjugado estão presentes na corrente sanguínea, uma vez que suas formas sulfatadas e glucuronídeos são encontradas em maiores concentrações [10,35,36]. Os mesmos conjugados foram detectados nas análises por LC-MS/MS<sup>E</sup>, confirmando, portanto, a validade da utilização de células intestinais e das configurações experimentais empregadas neste estudo.

As análises por MS/MS revelaram a presença de quatro derivados do RSV, compreendendo dois derivados sulfatados e dois glucuronídeos. Estes se constituem nos principais conjugados metabólicos do *trans*-resveratrol [36]. Além disso, as células endoteliais tratadas na configuração padrão com o polifenol não conjugado demonstraram claramente respostas biológicas distintas em relação às células endoteliais expostas à fração basolateral, coletada após o transporte de RSV e metabólitos por células Caco-2. Isto pode ser devido à baixa bioatividade dos metabólitos bem como a outras moléculas proteicas não identificadas neste estudo, secretadas pelas células Caco-2 durante o metabolismo celular. Conforme relatado na literatura, evidências sugerem a baixa biodisponibilidade do RSV e a baixa bioatividade de seus metabólitos [8,19,36]. Por outro lado, alterações no metabolismo do RSV como resultado do tratamento com TNF- $\alpha$  não foram observadas, indicando que o tempo de contato das células endoteliais com esse fator foi insuficiente para induzir mecanismos de “*crossstalk*” capazes de regular a absorção do polifenol e seu metabolismo pelas células intestinais.

Este estudo demonstrou que o RSV e seus metabólitos intestinais exercem um efeito protetor contra o estresse oxidativo e a inflamação em células endoteliais. Este efeito foi verificado em células endoteliais cultivadas em cocultura com células intestinais Caco-2 e em um sistema sequencial (pós-transporte), sob condições inflamatórias e não inflamatórias. Pela primeira vez, foi demonstrada a bioatividade do RSV e de seus metabólitos glucuronídeos e sulfatados na disfunção endotelial induzida por TNF- $\alpha$  em um modelo de cocultura. Constatou-se que o metabolismo de células endoteliais como um alvo biológico é

não somente influenciado pela ação de polifenóis, como também pela comunicação entre linhagens celulares distintas.

*Este trabalho foi financiado através do projeto BOF Special Research Fund (projeto 01B04212) e projeto Hercules (AUGE028 e AUGE014), e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (processo 248460/2013-7).*

*Os autores declaram não haver conflito de interesse.*

## Referências

- [1] Das M, Das DK. Resveratrol and cardiovascular health. *Mol. Aspects Med.* 2010, 31, 503–12.
- [2] Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002, 420, 19–26.
- [3] Hajjar DP, Gotto AM. Biological relevance of inflammation and oxidative stress in the pathogenesis of arterial diseases. *Am. J. Pathol.* 2013, 182, 1474–81.
- [4] Tabruyn SP, Mémet S, Avé P, Verhaeghe C, Mayo KH, Struman I, Martial JA, Griffioen AW. NF- $\kappa$ B activation in endothelial cells is critical for the activity of angiostatic agents. *Mol. Cancer Ther.* 2009, 8, 2645–54.
- [5] Ruiz-Núñez B, Pruiomboom L, Dijck-Brouwer DAJ, Muskiet FAJ. Lifestyle and nutritional imbalances associated with Western diseases: causes and consequences of chronic systemic low-grade inflammation in an evolutionary context. *J. Nutr. Biochem.* 2013, 24, 1183–1201.
- [6] Khan F, Ray S, Craigie AM, Kennedy G, Hill A, Barton KL, Broughton J, Belch JFF. Lowering of oxidative stress improves endothelial function in healthy subjects with habitually low intake of fruit and vegetables: A randomized controlled trial of antioxidant- and polyphenol-rich blackcurrant juice. *Free Radical Biol. Med.* 2014, 72, 232–37.
- [7] Rodrigo R, Miranda A, Vergara, L. Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. *Clin. Chim. Acta* 2011, 412, 410–24.



- [8] Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004, 79, 727–47.
- [9] Gresele P, Cerletti C, Guglielmini G, Pignatelli P, Gaetano G, Violi F. Effects of resveratrol and other wine polyphenols on vascular function: an update. *J. Nutr. Biochem.* 2011, 22, 201–11.
- [10] Saiko P, Szakmary A, Jaeger W, Szekeres T. Resveratrol and its analogs: Defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad? *Mutat. Res.* 2008, 658, 68–94.
- [11] Simão F, Pagnussat AS, Seo JH, Navaratna D, Leung W, Lok J, Guo S, Waeber C, Salbego CG, Lo EH. Pro-angiogenic effects of resveratrol in brain endothelial cells: nitric oxide-mediated regulation of vascular endothelial growth factor and metalloproteinases. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2012, 32, 884–95.
- [12] Scoditti E, Calabriso N, Massaro M, Pellegrino M, Storelli C, Martines G, De Caterina R, Carluccio MA. Mediterranean diet polyphenols reduce inflammatory angiogenesis through MMP-9 and COX-2 inhibition in human vascular endothelial cells: A potentially protective mechanism in atherosclerotic vascular disease and cancer. *Arch. Biochem. Biophys.* 2012, 527, 81–9.
- [13] Cicha I, Regler M, Urschel K, Goppelt-Struebe M, Daniel WG, Garlichs CDJ. Resveratrol inhibits monocytic cell chemotaxis to MCP-1 and prevents spontaneous endothelial cell migration through Rho kinase-dependent mechanism. *J. Atheroscler. Thromb.* 2011, 18, 1031–42.
- [14] Gresele P, Pignatelli P, Guglielmini G, Carnevale R, Mezzasoma AM, Ghiselli A, Momi S, Violi F. Resveratrol, at concentrations attainable with moderate wine consumption, stimulates human platelet nitric oxide production. *J. Nutr.* 2008, 138, 1602–08.
- [15] Nagai N, Kubota S, Tsubota K, Ozawa. Resveratrol prevents the development of choroidal neovascularization by modulating AMP-

activated protein kinase in macrophages and other cell types. *J. Nutr. Biochem.* 2014, 25, 1218–25.

[16] Csiszar A, Smith K, Labinskyy N, Orosz Z, Rivera A, Ungvari Z. Resveratrol attenuates TNF- $\alpha$ -induced activation of coronary arterial endothelial cells: role of NF- $\kappa$ B inhibition. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2006, 291, 1694–99.

[17] Thiel G, Rossler, OG. Resveratrol stimulates AP-1-regulated gene transcription. *Mol. Nutr. Food Res.* 2014, 58, 1402–13.

[18] Storniolo CE, Moreno JJ. Resveratrol metabolites have an antiproliferative effect on intestinal epithelial cancer cells. *Food Chem.* 2012, 134, 1385–91.

[19] Polycarpou E, Meira LB, Carrington S, Tyrrell E, Modjtahedi H, Carew MA. Resveratrol 3-O-D-glucuronide and resveratrol 4-O-D-glucuronide inhibit colon cancer cell growth: Evidence for a role of A3 adenosine receptors, cyclin D1 depletion, and G1 cell cycle arrest. *Mol. Nutr. Food Res.* 2013, 57, 1708–17.

[20] Maaser C, Schoeppner S, Kucharzik T, Kraft M, Schoenherr E, Domschke W, Luegering N. Colonic epithelial cells induce endothelial cell expression of ICAM-1 and VCAM-1 by a NF- $\kappa$ B-dependent mechanism. *Clin. Exp. Immunol.* 2001, 124, 208–13.

[21] Kuntz S, Asseburg H, Dold S, Römpf A, Fröhling B, Kunz C, Rudloff S. Inhibition of low-grade inflammation by anthocyanins from grape extract in an in vitro epithelial-endothelial co-culture model. *Food Funct.* 2015, 4, 1136–49.

[22] Notarnicola M, Pisanti S, Tutino V, Bocale D, Rotelli MT, Gentile A, Memeo V, Bifulco M, Perri E, Caruso MG. Effects of olive oil polyphenols on fatty acid synthase gene expression and activity in human colorectal cancer cells. *Genes Nutr.* 2011, 6, 63–9.

[23] Calatayud M, Gimeno J, Vélez D, Devesa V, Montoro R. Characterization of the intestinal absorption of arsenate, monomethylarsonic acid, and dimethylarsinic acid using the caco-2 cell line. *Chem. Res. Toxicol.* 2010, 23, 547–56.

- [24] Gonzales GB, Raes K, Coelus S, Struijs K, Smagghe G, Van Camp J. Ultra (high)-pressure liquid chromatography–electrospray ionization-time-of-flight-ion mobility-high definition mass spectrometry for the rapid identification and structural characterization of flavonoid glycosides from cauliflower waste. *J. Chromatogr. A* 2014, *1323*, 39–48.
- [25] Chiesi C, Fernandez-Blanco C, Cossignani L, Font G, Ruiz MJ. Alternariol-induced cytotoxicity in Caco-2 cells. Protective effect of the phenolic fraction from virgin olive oil. *Toxicon* 2015, *93*, 103–11.
- [26] Harrison DJ, Gongora MC. Oxidative Stress and Hypertension. *Med. Clin. N. Am.* 2009, *93*, 621–635.
- [27] Claude S, Boby C, Rodriguez-Mateos A, Spencer JPE, Gérard N, Morand C, Milenkovic D. Flavanol metabolites reduce monocyte adhesion to endothelial cells through modulation of expression of genes via p38-MAPK and p65-Nf-kB pathways. *Mol. Nutr. Food Res.* 2014, *58*, 1016–1027.
- [28] Das S, Alagappan VKT, Bagchi D, Sharma HS, Maulik N, Das DK. Coordinated induction of iNOS–VEGF–KDR–eNOS after resveratrol consumption: A potential mechanism for resveratrol preconditioning of the heart. *Vascul. Pharmacol.* 2005, *42*, 281–289.
- [29] Kim JJ, Lee SB, Park JK, Yoo YD. TNF- $\alpha$ -induced ROS production triggering apoptosis is directly linked to Romo1 and Bcl-XL. *Cell Death Differ.* 2010, *17*, 1420–1434.
- [30] Palomer X, Capdevila-Busquets E, Álvarez-Guardia D, Barroso E, Pallàs M, Camins A, Davidson MM, Planavila A, Villarroya F, Vázquez-Carrera M. Resveratrol induces nuclear factor- $\kappa\beta$  activity in human cardiac cells. *Int. J. Cardiol.* 2013, *167*, 2507–2516.
- [31] Sanacora S, Manna S, Singha B, Chang T, Ramaswami S, Vancurova I. Regulation of NF- $\kappa\beta$ -dependent interleukin-8 in human macrophages by nuclear I $\kappa$ B $\alpha$  and proteasome inhibition. *FASEB J.* 2013, *27*, 550–517.

[32] Penumathsa SV, Koneru S, Samuel SM, Maulik G, Bagchi D, Yet SF, Menon VP, Maulik N. Strategic targets to induce neovascularization by resveratrol in hypercholesterolemic rat myocardium: Role of caveolin-1, endothelial nitric oxide synthase, hemoxygenase-1, and vascular endothelial growth factor. *Free Radical Biol. Med.* 2008, 45, 1027–1034.

[33] Ladurner A, Schachner D, Schueller K, Pignitter M, Heiss EH, Somoza V, Dirsch VM. Impact of trans-resveratrol-sulfates and -glucuronides on endothelial nitric oxide synthase activity, nitric oxide release and intracellular reactive oxygen species. *Molecules* 2014, 19, 16724–36.

[34] Kaldas MI, Walle UK, Walle T. Resveratrol transport and metabolism by human intestinal Caco-2 cells. *J. Pharm. Pharmacol.* 2002, 55, 307–12.

[35] Walle T, Hsieh F, DeLegge MH, Oatis JE, Walle UK. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab. Dispos.* 2004, 32, 1377–82.

[36] Menet MC, Cottart CH, Taghi M, Nivet-Antoine V, Dargère D, Vibert F, Laprévoté O, Beaudeux J-L. Ultra high performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight analysis for the identification and the determination of resveratrol and its metabolites in mouse plasma. *Anal. Chim. Acta* 2013, 761, 128–136.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

As composições fenólica e elementar foram determinadas em sucos de uva tintos e branco das diferentes variedades *V. labrusca* L.: Bordô, Concord, Niágara Branca e Isabel; amplamente cultivadas na região Sul do Brasil e de grande expressividade na atividade vitícola. Além do perfil fenólico, de macro e microelementos, e da atividade antioxidante *in vitro*, este trabalho demonstrou pela primeira vez o potencial bioativo de sucos de uva Isabel e Bordô em humanos.

Considerando o consumo de uvas e seus derivados, os benefícios à saúde são tradicionalmente atribuídos aos vinhos de uvas viníferas. Entretanto, foi demonstrado que as uvas *V. labrusca* L. e o suco de uva são ricos em polifenóis bioativos das diversas classes fenólicas e apresentam elevada capacidade antioxidante. A caracterização química, fenólica e elementar e os estudos *in vitro* e *in vivo* permitiram identificar as principais características de identidade e tipicidade de sucos de uva *V. labrusca* L., bem como as diferenças entre os sucos de uva orgânico e convencional e as características de absorvidade e bioatividade de um dos mais importantes fitoquímicos bioativos, o *trans*-resveratrol. Infere-se, portanto, que a composição fenólica das uvas americanas é principalmente influenciada pela variedade e condições de cultivo.

A adição de sementes de uva bem como a otimização da atividade pectinolítica exerceram forte influência no conteúdo fenólico, na concentração de minerais essenciais e na atividade antioxidante *in vitro*, elevando o potencial bioativo dos sucos. A utilização desses ingredientes na produção do suco de uva representa uma abordagem atrativa e factível quanto ao enriquecimento de alimentos naturais com polifenóis e seus benefícios à saúde, além de uma alternativa ecológica para o aproveitamento de resíduos da viticultura, como as sementes. Adicionalmente, é importante a menção à correta reutilização e aplicação de resíduos da fruticultura, uma vez que os estudos dessas matrizes vegetais devem ser voltados não somente às questões de rendimento de processo e lucratividade, como também às características toxicológicas, sanitárias e microbiológicas do material pesquisado, permitindo, dessa forma, o aproveitamento consciente de resíduos para aplicações seguras.

No estudo com células humanas, os efeitos biológicos do *trans*-resveratrol após os eventos de absorção e conjugação intestinal sobre a

modulação de funções cardiovasculares foram demonstrados pioneiramente através de modelo *in vitro* de cocultura de células Caco-2 e células endoteliais EA.hy926. Na cocultura, duas linhagens celulares humanas distintas foram cultivadas em comunicação semidireta, propiciando mecanismos de “*crosstalk*” entre as diferentes células. Por conseguinte, constatou-se que o metabolismo de células endoteliais como um alvo biológico não é somente influenciado pela ação de polifenóis, como também pela comunicação em nível molecular entre células ou tecidos distintos, levando a um conhecimento mais profícuo acerca da situação *in vivo*, a fim de explorar abordagens terapêuticas.

No estudo com seres humanos, a diminuição das concentrações de peróxidos lipídicos e o aumento das defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas em indivíduos saudáveis, após a ingestão dos sucos de uva orgânico e convencional, corroboram a relevância do suco de uva como fonte natural de compostos fenólicos com propriedades bioativas. Neste estudo de intervenção aguda, as diferenças químicas entre sucos de uva associadas aos sistemas de cultivo não foram fator preditivo para as respostas biológicas *in vivo*. Contudo, sugere-se o direcionamento de pesquisas futuras em longo prazo e com maior número de participantes, de modo a avaliar os reais benefícios do consumo de sucos de uva *V. labrusca* L. frente à intervariabilidade de indivíduos e às interferências da dieta e estilos de vida. Não obstante, é importante salientar que o suco de uva orgânico é produzido em um ciclo biológico sustentável, sem a utilização de substâncias fertilizantes, pesticidas ou compostos sintéticos, oferecendo um alimento diferenciado aos consumidores.

Com relação aos impactos na saúde, ressalta-se a importância de avaliar as propriedades bioativas de polifenóis e suas misturas, no suco de uva ou outras matrizes alimentares, a partir de seus efeitos sob condições *in vivo*, assumindo assim uma diversidade de mecanismos fisiológicos que ocorrem em sistemas biológicos complexos como o organismo humano. Além disso, uma vez que o suco de uva *V. labrusca* L. é rico em minerais, açúcares, ácidos orgânicos e compostos fenólicos, faz-se imprescindível a preservação de suas qualidades nutricionais, sensoriais e bioativas, desde a sua produção até a disponibilização ao consumidor, bem como o conhecimento e a valorização do suco de uva brasileiro como um alimento funcional, natural e típico da viticultura nacional.

## REFERÊNCIAS

- ALIMARDANI-THEUIL, P.; GAINVORS-CLAISSE, A.; DUCHIRON, F. Yeasts: An attractive source of pectinases – From gene expression to potential applications: A review. *Process Biochemistry*, 46, p. 1525–1537, 2011.
- ALVES, E. A.; GUIMARÃES, A. C. R. Cultivo celular. In: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. *Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde*. Rio de Janeiro: INCQS/Fiocruz, 2011. 38 p.
- ARCARI, S. G. Caracterização química de vinhos fortificados produzidos em diferentes regiões do Brasil. 2010. 198 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- ARCARI, S. G.; CHAVES, E. S.; VANDERLINDE, R.; ROSIER, J. P.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Brazilian fortified wines: Chemical composition, chromatic properties and antioxidant activity. *Food Research International*, v. 53, p. 164-173, 2013.
- ARON, P. M.; KENNEDY, J. A. Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological activity. *Molecular Nutrition & Food Research*, v. 52, p. 79-104, 2008.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de Nutrição*, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.
- 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.

BONNEFOY, M.; DRAI, J.; KOSTKA, T. Antioxidants to slow aging, facts and perspectives. *Presse Medicale*, v. 31, n. 25, p. 1174-1184, 2002.

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. Resolução nº 196, de 10 de outubro de 1996. Dispõe sobre as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. *Diário Oficial da União*, Brasília, 10 out. 1996.

BRASIL. Decreto nº 3.510, de 16 de junho de 2000. Altera dispositivos do regulamento aprovado pelo Decreto 2.314, de 4 de setembro de 1997, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. *Diário Oficial da União*, Brasília, 2000.

BRASIL. Lei nº 10.831, de 23 de dezembro de 2003. Dispõe sobre a agricultura orgânica e dá outras providências. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. *Diário Oficial da União*, Brasília, 23 dez. 2003.

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. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. *Diário Oficial da União*, Brasília, 30 jul. 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 24, de 8 de setembro de 2005. Aprova Manual Operacional de Bebidas e Vinagres, onde constam o Modelo de Manual da Qualidade, o Protocolo de Validação de Métodos Físico-químicos, o Protocolo do de Cálculo da incerteza associada às medições e os métodos de análise de bebidas fermentadas, destiladas, não-alcoólicas, de vinagre, que passam a constituir padrões oficiais para análise físico-química de bebidas e vinagre. *Diário Oficial da União*, Brasília, 20 set. 2005.



BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 64, de 18 de dezembro de 2008. Aprova o Regulamento Técnico para os Sistemas Orgânicos de Produção Animal e Vegetal. *Diário Oficial da União*, Brasília, 19 dez. 2008.

BRASIL. Instrução Normativa nº 46, de 6 de outubro de 2011. Estabelece o Regulamento Técnico para os Sistemas Orgânicos de Produção Animal e Vegetal, bem como as listas de Substâncias Permitidas para uso nos Sistemas Orgânicos de Produção Animal e Vegetal. *Diário Oficial da União*, Brasília, 6 out. 2011.

BROWNLEADRES, M. D.; JACKSON, P.; MOBASHERI, A.; PANTELIDES, A. T; SUMAR, S.; TREVAN, M.; DEY, P.M. Molecular aspects of cell wall modifications during fruit ripening. *Food Science & Nutrition*, v. 32, p. 149-164, 1999.

BUB, A.; WATZL, B.; HEEB, D.; RECHKEMMER, G.; BRIVIBA, K. Malvidin-3-glucoside bioavailability in humans after ingestion of red wine, dealcoholized red wine and red grape juice. *European Journal of Nutrition*, v. 40, p. 113-120, 2001.

BUCHNER, I.; MEDEIROS, N.; LACERDA, D. S.; NORMANN, C. A. B. M.; GEMELLI, T.; RIGON, P.; WANNMACHER, C. M. D.; HENRIQUES, J. A. P.; DANI, C.; FUNCHAL, C. Hepatoprotective and antioxidant potential of organic and conventional grape juices in rats fed a high-fat diet. *Antioxidants*, v. 3, p. 323-338, 2014.

BURIN, V. M. Caracterização de clones da variedade Cabernet Sauvignon: uvas e vinhos de São Joaquim, Santa Catarina. 2010. 158 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

BURIN, V. M.; FALCÃO, L. D.; GONZAGA, L. V.; FETT, R.; ROSIER, J. P.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Colour, phenolic content and antioxidant activity of grape juice. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 30, n. 4, p. 1027-1032, 2010.

CABRITA, M. J.; RICARDO-DA-SILVA, J.; LAUREANO, O. Os compostos polifenólicos das uvas e dos vinhos. In: I SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE VITIVINICULTURA, 2003. Lisboa. *Resumos...* Lisboa: Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, 2003, p. 61-100.

CADAHIA, E.; SIMÓN, B.F.; SANZ, M.; POVEDA, P.; COLIO, J. Chemical and chromatic characteristics of Tempranillo, Cabernet Sauvignon and Merlot wines from DO Navarra aged in Spanish and French oak barrels. *Food Chemistry*, v.115, p.639-649, 2009.

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

CAMARGO, U. A.; MAIA, J. D. G.; RITSCHER, P. S. *Novas cultivares brasileiras de uva*. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2010. 64 p.

CAMARGO, U. A.; TONIETTO, J.; HOFFMANN, A. Progressos na viticultura brasileira. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. E., p. 144-149, 2011.

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.

CASTILLA, P.; ECHARRI, R.; DÁVALOS, A.; CERRATO, F.; ORTEGA, H.; TERUEL, J. L.; LUCAS, M. F.; GÓMEZ-CORONADO, D.; ORTUNO, J.; LASUNCIÓN, M. Concentrated red grape juice exerts antioxidant, hypolipidemic, and antiinflammatory effects in both hemodialysis patients and healthy subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 84, p. 252-262, 2006.

CHAMORRO, S.; VIVEROS, A.; ALVAREZ, I.; VEJA, E.; BRENES, A. Changes in polyphenol and polysaccharide content of grape seed extract and grape pomace after enzymatic treatment. *Food Chemistry*, v. 133, p. 308-314, 2012.

CHANTRET, I.; TRUGNAN, G.; DUSSAULX, E.; ZWEIBAUM, A.; ROUSSET, M. Monensin inhibits the expression of sucrase-isomaltase

in Caco-2 cells at the mRNA level. *FEBS Letters*, v. 235, p. 125-128, 1988.

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

CHIVA-BLANCH, G.; URPI-SARDA, M.; ROS, E.; VALDERAS-MARTINEZ, P.; CASAS, R.; ARRANZ, S.; GUILLÉN, M.; LAMUEL-RAVENTÓS, R. M.; LLORACH, R.; ANDRES-LACUEVA, C.; ESTRUCH, R. Effects of red wine polyphenols and alcohol on glucose metabolism and the lipid profile: A randomized clinical trial. *Clinical Nutrition*, v. 32, p. 200-206, 2013.

CHU, L. M.; LASSALETTA, A. D.; ROBICH, M. P.; LIU, Y.; BURGESS, T.; LAHAM, R. J.; SWEENEY, J. D.; SHEN, T. L.; SELLKE, F. W. Effects of red wine and vodka on collateral-dependent perfusion and cardiovascular function in hypercholesterolemic swine. *Circulation*, v. 126, p. 65-72, 2012.

DAGLIA, M. Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 23, p. 1-8, 2011.

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.

DELOIRE, A.; KRAEVA, E.; DAÍ, G. H.; RENAULT, A. S.; ROCHARD, J.; CHATELAIN, C.; CARBONNEAU, A.; ANDARY, C. Les mécanismes de défense de la vigne. Des utilisations possibles pour lutter contre les pathogènes. *Phytoma*, v. 510, p. 46-51, 1998.

DI RENZO, L.; MARSELLA, L. T.; CARRARO, A.; VALENTE, R.; GUALTIERI P.; GRATTEI, S.; TOMASI, D.; GAIOTTI, F.; DE LORENZO, A. Changes in LDL oxidative status and oxidative and inflammatory gene expression after red wine intake in healthy people: a randomized trial. *Mediators of Inflammation*, p. 1-13, 2015.

DILLENBURG, D. R.; MOSTARDA, C.; MORAES-SILVA, I. C.; FERREIRA, D.; BÓS, D. S. G.; DUARTE, A. M. M.; IRIGOYEN, M. C.; RIGATTO, K. Resveratrol and grape juice differentially ameliorate cardiovascular autonomic modulation in L-NAME-treated rats. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, v. 179, p. 9-13, 2013.

DULUC, L.; JACQUES, C.; SOLETI, R.; IACOBAZZI, F.; SIMARD, G.; ANDRIANTSITOHAINA, R. Modulation of mitochondrial capacity and angiogenesis by red wine polyphenols via estrogen receptor, NADPH oxidase and nitric oxide synthase pathways. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 45, p. 783-91, 2013.

ECOCERT. Ecocert Brasil Certificadora. *Produtos orgânicos*, 2013. Disponível em: <<http://www.ecocert.com.br/organicos.html>>. Acesso em: 12 jan. 2013.

EMATER. Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Rio Grande do Sul. (EMATER/RS). *Produção de uva orgânica*. 6º Seminário Regional da Uva Orgânica. Bento Gonçalves, 2012. Disponível em: <<http://www.emater.tche.br/site/noticia.php?id=14899>>. Acesso em: 16 ago. 2013.

EPAGRI. Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina. *Zoneamento Agroecológico e Socioeconômico do Estado de Santa Catarina*. Florianópolis: EPAGRI, 1999. 1010 p.

FAN, P.; LOU, H. Effects of polyphenols from grape seeds on oxidative damage to cellular DNA. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 67, p. 67-74, 2004.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. *Global forum on food security and nutrition: Knowledge sharing for improved food security and better nutrition*. Rome: FAO, 2010. 64 p.

FENOCCHIO, P. Competição da matéria-prima para elaboração de suco de uva. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 8, n. 8, p. 263-266, 1973.

FERREIRA, E. C.; RODRIGUES, S. H. B. G.; FERREIRA, M. M. C.; NÓBREGA, J. A.; NOGUEIRA, A. R. A. Análise exploratória dos teores de constituintes inorgânicos em sucos e refrigerantes de uva. *Eclética Química*, v. 27, 2002.

FUNCHAL, C.; DANI, C. *Neurociência: modelos experimentais em animais*. Porto Alegre: Editora Universitária Metodista IPA: EDIPUCRS, 2014. 280 p.

GAETANI, G.D.; PARKER, J.C.; KIRKMAN, H. N. Intracellular restraint: a new basis for the limitation in response to oxidative stress in human erythrocytes containing low-activity variants of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Proc. of the National Academy of Sciences of United States of America*, v. 71, p. 3584-3587, 1974.

GIBIS, M.; WEISS, J. Antioxidant capacity and inhibitory effect of grape seed and rosemary extract in marinades on the formation of heterocyclic amines in fried beef patties. *Food Chemistry*, v. 134, p. 766-774, 2012.

GOIS, J. S. Avaliação analítica de sistemas de introdução de amostra para a determinação de elementos traço em extratos lixiviados contendo ácido acético por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado. 2012. 104 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

GOTTLIEB, M. G. V.; BONARDI, G.; MORIGUCHI, E. H. Fisiopatologia e aspectos inflamatórios da aterosclerose. *Scientia Medica*, v. 15, n. 3, 2005.

GRIGOLETTI, A.; SÔNEGO, O. R. *Principais doenças fúngicas da videira no Brasil*. Bento Gonçalves: EMBRAPA Uva e Vinho, 1993. 36 p.

GRINDLAY, G.; MORA, J.; MAESTRE, S.; GRAS, L. Application of a microwave-based desolvation system for multi-elemental analysis of wine by inductively coupled plasma based techniques. *Analytica Chimica Acta*, v. 629, p. 24-37, 2008.

GRIS, E. F. Perfil fenólico e atividades antioxidante e hipolipemiante de vinhos de variedades *Vitis vinifera* cultivadas em São Joaquim – SC - Brasil. 2010. 179 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

GRIS, E. F.; MATTIVI, F.; FERREIRA, E. A.; VRHOVSEK, U.; FILHO, D. W.; PEDROSA, R. C.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Stilbenes and tyrosol as target compounds in the assessment of antioxidant and hypolipidemic activity of *Vitis vinifera* red wines from Southern Brazil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 59, p. 7954-7961, 2011a.

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

GRIS, E. F.; MATTIVI, F.; FERREIRA, E. A.; VRHOVSEK, U.; FILHO, D. W.; PEDROSA, R. C.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Phenolic profile and effect of regular consumption of Brazilian red wines on *in vivo* antioxidant activity. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 31, p. 31-40, 2013.

HAJJAR, D. P.; GOTTO, A. M. Biological relevance of inflammation and oxidative stress in the pathogenesis of arterial diseases. *American Journal of Pathology*, v. 182, p. 1474-81, 2013.

HAKIMUDDIN, F.; TIWARI, K.; PALIYATH, G.; MECKLING, K. Grape and wine polyphenols down-regulate the expression of signal transduction genes and inhibit the growth of estrogen receptor–negative MDA-MB231 tumors in nu/nu mouse xenografts. *Nutrition Research*, v. 28, p. 702-713, 2008.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. *Free Radical Biology and Medicine*. 3 ed. New York: Oxford University Press, 1999.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in Enzymology*, v. 186, p. 1-85, 1990.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Levantamento sistemático da produção agrícola*. Pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. Brasília: IBGE, 2012. 126 p.

IBRAVIN. Instituto Brasileiro do Vinho. *Vinhos do Brasil: Principais regiões produtoras*, 2013. Disponível em: <<http://www.ibravin.org.br/regioesprodutoras.php>>. Acesso em: 16 jan. 2013.

JACKSON, R. S. Chemical constituents of grapes and wine. In: *Wine Science: Principles and Applications*. 3 ed. San Diego: Elsevier Inc., 2008. p. 270-331.

JACOB, J. K.; HAKIMUDDIN, F.; PALIYATH, G.; FISHER, H. Antioxidant and antiproliferative activity of polyphenols in novel high-polyphenol grape lines. *Food Research International*, v. 41, p. 419-428, 2008.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 2931-2944, 2005.

JUNG, K. J.; WALLIG, M. A.; SINGLETARY, K. W. Purple grape juice inhibits 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)- induced rat mammary tumorigenesis and *in vivo* DMBA-DNA adduct formation. *Cancer Letters*, v. 233, n. 2, p. 279-288, 2006.

KASHYAP, D. R.; VOHRA, P. K.; CHOPRA, A.; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology*, v. 77, p. 215-227, 2001.

KEMPERMAN, R. A.; GROSS, G.; MONDOT, S.; POSSEMIERS, S.; MARZORATI, M.; WIELE, T. V.; DORÉ, J.; VAUGHAN, E. E. Impact of polyphenols from black tea and red wine/grape juice on a gut

model microbiome. *Food Research International*, v. 53, p. 659-669, 2013.

KIERSZENBAUM, A. L.; TRES, L. L. *Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology*. 3rd ed. Philadelphia: Elsevier, 2012. 720 p.

KLINGE, C. M.; WICKRAMASINGHE, N. S.; IVANOVA, M. M.; DOUGHERTY, S. M. Resveratrol stimulates nitric oxide production by increasing estrogen receptor alpha-Src-caveolin-1 interaction and phosphorylation in human umbilical vein endothelial cells. *The FASEB Journal*, v. 22, p. 185-97, 2008.

KOSINSKA, A.; ANDLAUER, W. Cocoa polyphenols are absorbed in Caco-2 cell model of intestinal epithelium. *Food Chemistry*, v. 135, p. 999-1005, 2012.

KWON, Y. *Handbook of Essential Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Drug Metabolism for Industrial Scientists*. New York: Kluwer Academic Publishers, 2002. 291 p.

LANDBO, A. K.; MEYER, A. S. Effects of different enzymatic maceration treatments on enhancement of anthocyanins and other phenolics in black currant juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v. 5, p. 503-513, 2004.

LIMA, M. S.; SILANI, I. S. V.; TOALDO, I. M. T.; CORREA, L. C.; BIASOTO, A. C. T.; PEREIRA, G. D.; BORDIGNON-LUIZ, M. T.; NINOW, J. L. Phenolic compounds, organic acids and antioxidant activity of grape juices produced from new Brazilian varieties planted in the Northeast Region of Brazil. *Food Chemistry*, v. 161, p. 94-103, 2014.

LÖNN, M. E.; DENNIS, J. M.; STOCKER, R. Actions of "antioxidants" in the protection against atherosclerosis. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 53, p. 863-884, 2012.

LÓPEZ-ALARCÓN, C.; DENICOLA, A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Analytica Chimica Acta*, v. 763, p. 1-10, 2013.



MAIA, J. D. G.; CAMARGO, U. A. *O cultivo da videira Niágara no Brasil*. Brasília: Embrapa, 2012. 301 p.

MAIER, T.; GÖPPERT, A.; KAMMERER, D. R.; SCHIEBER, A.; CARLE, R. Optimisation of a process for enzyme assisted pigment extraction from grape (*Vitis vinifera* L.) pomace. *European Food Research and Technology*, v. 227, p. 267-275, 2008.

MAKRIS, D. P.; KALLITHRAKA, S.; KEFALAS, P. Flavonols in grapes, grape products and wines: Burden, profile and influential parameters. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 19, p. 396-404, 2006.

MALACRIDA, C. R.; MOTTA, S. Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 25, n. 4, 2005.

MANACH, C.; WILLIAMSON, G.; MORAND, C.; SCALBERT, A.; RÉMÉSY, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 81, n. 1, p. 2305-2425, 2005.

MANSUR, A. P.; FAVARATO, D. Mortality due to cardiovascular diseases in Brazil and in the metropolitan region of São Paulo: A 2011 Update. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 99, p. 755-761, 2012.

MARZAROTTO, V. Suco de Uva. In: VENTURINI FILHO, W. G. *Tecnologia de Bebidas: Matéria-prima, processamento, BPF/APPCC, legislação, mercado*. São Paulo: Edgard Blücher, 2005, p. 311-345.

MAZZA, G.; MINIATI, E. *Anthocyanins in fruits, vegetables and grains*. Florida: Boca Raton, CRC Press, 1993. 362 p.

McCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*, v. 244, p. 6049-6055, 1969.

McKINNON, A. J.; CATTRALL, R. W.; SCHOLLARY, G. R. Aluminum in wine – its measurement and identification of major

sources. *American Journal of Enology and Viticulture*, 43, p. 166-170, 1992.

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

MELLO, L. M. R. *Vitivinicultura brasileira: panorama 2014*. Bento Gonçalves: EMBRAPA Uva e Vinho, 2014.

MELLO, L. M. R. *Vitivinicultura brasileira: panorama e atuação no mercado em 2012*. Bento Gonçalves: EMBRAPA Uva e Vinho, 2012.

MOJZIS, J.; VARINSKA, L.; MOJZISOVA, G.; KOSTOVA, I.; MIROSSAY, L. Antiangiogenic effects of flavonoids and chalcones. *Pharmacological Research*, v. 57, p. 259-265, 2008.

MORENO, A.; CASTRO, M.; FALQUÉ, E. Evolution of trans- and cis-resveratrol content in red grapes (*Vitis vinifera* L. cv Mencía, Albarello and Merenzao) during ripening. *European Food Research and Technology*, v.227, p.667-674, 2008.

MORGANO, M. A.; QUEIROZ, S. C. N.; FERREIRA, M. M. C. Determinação dos teores de minerais em sucos de frutas por espectrometria de emissão óptica em plasma indutivamente acoplado (ICP-OES). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 19, n. 3, 1999.

MOURE, A.; CRUZ, J. M.; FRANCO, D.; DOMINGUEZ, J. M.; SINEIRO, J.; DOMINGUEZ, H.; NUNÉZ, M. J.; PARAJÓ, J. C. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, v. 72, p. 145-171, 2001.

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.

NEGRÃO, R.; COSTA, R.; DUARTE, D.; GOMES, T. T.; AZEVEDO, I.; SOARES, R. Different effects of catechin on angiogenesis and inflammation depending on VEGF levels. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 24, p. 435-44, 2013.

NIKI, E. Assessment of Antioxidant Capacity *in vitro* and *in vivo*. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 49, p. 503-515, 2010.

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.

NOGUER, M. A.; CERESO, A. B.; NAVARRO, E. D.; GARCIA-PARRILLA, M. C. Intake of alcohol-free red wine modulates antioxidant enzyme activities in a human intervention study. *Pharmaceutical Research*, v. 65, p. 609-614, 2012.

NORDBERG, J.; ARNER, E. S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, 2001.

O'BYRNE, D. J.; DEVARAJ, S.; GRUNDY, S. M.; JIALAL, I. Comparison of the antioxidant effects of Concord grape juice flavonoid and a-tocopherol on markers of oxidative stress in healthy adults. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v.76, n. 6, p. 1367-1374, 2002.

OLIVEIRA, J. E. M.; LOPES, P. R. C.; HAJI, F. N. P.; MOREIRA, A. N.; MIRANDA, J. R. Produção Integrada de Uva no Vale do São Francisco. In: ZAMBOLIM, L.; NASSER, L. C. B.; ANDRIGUETO, J. R.; TEIXEIRA, J. M.; FACHINELLO, J. C. (Eds.). *Produção integrada no Brasil*. Brasília: MAPA, 2009. p. 915-934.

PACE-ASCIAK, C. R.; ROUNOVA, O.; HAHN, S. E.; DIAMANDIS, E. P.; GOLDBERG, D. M. Wines and grape juices as modulators of platelet aggregation in healthy human subject. *Clinica Chimica Acta*, v. 246, p. 163-182, 1996.

PAIVA, E.; LIMA, M.S.; PAIXÃO, J.A. Pectina: propriedades químicas e importância sobre a estrutura da parede celular de frutos durante o processo de maturação. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, v. 10, p. 196-211, 2009.

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

PARDO, F.; SALINAS, M. R.; ALONSO, G. L.; NAVARRO, G.; HUERTA, M. D. Effect of diverse enzyme preparations on the extraction and evolution of phenolic compounds in red wines. *Food Chemistry*, v. 67, p. 135-142, 1999.

PARKIN, K. L. Enzimas. In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. (Eds.). *Química de Alimentos*. 4ª ed. Porto Alegre: Artmed S.A., 2010. p. 264-316.

PERKINS-VEAZIE, P.; COLLINS, J. K. Contributions of nonvolatile phytochemicals to nutrition and flavor. *HortTechnology*, v. 11, n. 4, 2001.

PIAN, L. B.; ALMAGRO, A. C.; NETO, F. R.; GASPAROTTO, A. C.; MESSIAS, S. S.; CALDAS, R. G.; SANTOS NETO, J.; HATA, F. T.; SENA, J. O. A. Produtividade da uva rústica Concord sobre três diferentes porta-enxertos, cultivada em sistema de produção orgânico. *Revista Brasileira de Agroecologia*, v. 4, n. 2, 2009.

PRAMPARO, P., MONTANO, C. M., BARCELO, A., AVEZUM, A., WILKS, R. Cardiovascular diseases in Latin America and the Caribbean: The present situation. *Prevention and Control*, v. 2, p. 149-157, 2006.

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.; MELLO, L. M. R. *A vitivinicultura brasileira: realidade e perspectivas*. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2008.

PROTAS, J. F. S.; CAMARGO, U. A. *Vitivinicultura brasileira: panorama setorial de 2010*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2011. 108 p.

RANG, H.P.; DALE, M.M. *Pharmacology*, 6 ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2007, 776 p.

REVILLA, E.; RYAN, J. M. Analysis of several phenolic compounds with potential antioxidant properties in grape extracts and wines by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection without sample preparation. *Journal of Chromatography A*, v. 881, p.461-469, 2000.

RIBÉREAU-GAYON, P. *Identification d'esters des acides cinnamiques et de l'acide tartrique dans les limbes et les baies de V. vinifera*. Paris: CR de l'Académie des Sciences, v. 260, 1965. 341 p.

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

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

RIZZI, G. Chemical structure of colored Maillard reaction products. *Food Reviews International*, v. 13, p. 1-28, 1997.

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

RIZZON, L. A. Teor de cátions dos vinhos da Serra Gaúcha. In: *Vinho e Saúde: Vinho como Alimento Natural*. Bento Gonçalves. Simpósio Internacional Vinho e Saúde. Bento Gonçalves: Ibravin, 2005. p. 41-42.

RIZZON, L. A.; LINK, M. Composição do suco de uva caseiro de diferentes cultivares. *Ciência Rural*, v. 36, n. 2, 2006.

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

RIZZON, L. A.; SGANZERLA, V. M. A. Ácidos tartárico e málico no mosto de uva em Bento Gonçalves-RS. *Ciência Rural*, v. 37, p. 911-914, 2007.

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 Research International*, v. 44, p. 897-901, 2011a.

ROCKENBACH, I. I.; RODRIGUES, E.; GONZAGA, L. V.; CALIARI, V.; GENOVESE, M. I.; GONÇALVES, A. E. S. S.; FETT, R. Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red grapes (*Vitis vinifera* L. and *Vitis labrusca* L.) widely produced in Brazil. *Food Chemistry*, v. 127, p. 174-179, 2011b.

RODRIGO, R.; BOSCO, C. Oxidative stress and protective effects of polyphenols: comparative studies in human and rodent kidney. A review. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 142, p. 317-327, 2006.

RODRIGO, R.; MIRANDA, A.; VERGARA, L. Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. *Clinica Chimica Acta*, v. 412, p. 410-424, 2011.

ROMBALDI, C. V.; FERRI, V. C.; BERGAMASQUI, M.; LUCHETTA, L.; ZANUZO, M. R. Produtividade e qualidade de uva, cv. Bordô (Ives), sob dois sistemas de cultivo. *Revista Brasileira de Agrociência*, v. 10, n. 4, p. 519-521, 2004.

ROMERO-CASCALES, I.; ROS-GARCÍA, J. M.; LÓPEZ-ROCA, J. M.; GÓMEZ-PLAZA, E. The effect of a commercial pectolytic enzyme on grape skin cell wall degradation and colour evolution during the maceration process. *Food Chemistry*, v. 130, p. 626-631, 2012.

ROMERO, E. G.; MUÑOZ, G. S. Determination of organic acids in grape musts, wines and vineyards by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 655, p. 111-117, 1993.

ROMERO-PÉREZ, A. I.; IBERN-GÓMES, M.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M.; TORRE-BORONAT, M. C. Piceid, the major resveratrol derivative in grape juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 47, p. 1533-1536, 1999.

SANTALAD, A.; TEERAPORNCHASIT, P.; BURAKHAM, R.; SRIJARANAI, S. Capillary zone electrophoresis of organic acids in beverages. *LWT – Food Science and Technology*, v. 40, p. 1741-1746, 2007.

SANTANA, M. T. A.; SIQUEIRA, H. H.; REIS, K. C.; LIMA, L. C. O.; SILVA, R. J. L. Caracterização de diferentes marcas de sucos de uva comercializados em duas regiões do Brasil. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 32, n. 3, 2008.

SANTOS, L. P.; MORAIS, D. R.; SOUZA, N. E.; COTTICA, S. M.; BOROSKI, M.; VISENTAINER, J. V. Phenolic compounds and fatty acids in different parts of *Vitis labrusca* and *V. vinifera* grapes. *Food Research International*, v. 44, p. 1414-1418, 2011.

SAUTTER, C. K.; DENARDIN, S.; ALVES, A. O.; MALLMANN, C. A.; PENNA, N. G.; HECKTHEUER, L. H. Determinação de resveratrol em sucos de uva no Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 25, n. 3, p. 437-442, 2005.

SCALBERT, A.; MORAND, C.; MANACH, C.; RÉMÉSY, C. Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 56, p. 276-282, 2002.

SCODITTI, E.; CALABRISO, N.; MASSARO, M.; PELLEGRINO, M.; STORELLI, C.; MARTINES, G.; DE CATERINA, R.; CARLUCCIO, M. A. Mediterranean diet polyphenols reduce inflammatory angiogenesis through MMP-9 and COX-2 inhibition in human vascular endothelial cells: a potentially protective mechanism in atherosclerotic vascular disease and cancer. *Archives of Biochemistry and Biophysic*, v. 527, p. 81-89, 2012.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. *Food Phenolics: sources, chemistry, effects and applications*. Lancaster: Technomic, 1995, 331 p.

SHILS, M.E.; OLSON, J. A.; SHIKE, M. *Modern nutrition in health and disease*. 8 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1994.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry*, v. 215, n. 2, p. 213-219, 1993.

SILVA, H.; KLEINSTIVER, S. J.; SUNGAR, E.; RUBIN, R. H.; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, R.; PULIDO P.; SCHARGRODSKY H.; FRASER, H. S. Trends, challenges and promotion of clinical and cardiovascular research in Latin America and the Caribbean. *Prevention and Control*, v. 2, p. 129-135, 2006.

SILVEIRA, L. R. Considerações críticas e metodológicas na determinação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em células musculares durante contrações. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, v. 48, n. 6, p. 812-822, 2004.

SINGLETON, V. L. Oxygen with phenols and related reactions in muts, wines, and model systems: observations and practical implications. *American Journal of Enology and Viticulture*, v. 38, p. 69-77, 1987.

SOUZA, J. C. Atividade Antioxidante *in vitro* e *in vivo* de suco de uva e da norbixina. 2008. 95 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

STEIN, J. H.; KEEVIL, J. G.; WIEBE, D. A.; AESCHLIMANN, S.; FOLTS, J.D. Purple grape juice improves endothelial function and reduces the susceptibility of LDL cholesterol to oxidation in patients with coronary artery disease. *Circulation*, v. 100, p. 1050-1055, 1999.

STORNILO, C. E.; MORENO, J. J. Resveratrol metabolites have an antiproliferative effect on intestinal epithelial cancer cells. *Food Chemistry*, v. 134, p. 1385-1391, 2012.

TABRUYN, S. P.; MÉMET, S.; AVÉ, P.; VERHAEGHE, C.; MAYO, K. H.; STRUMAN, I.; MARTIAL, J. A.; GRIFFIOEN, A. W. NF- $\kappa$ B activation in endothelial cells is critical for the activity of angiostatic agents. *Molecular Cancer Therapeutics*, v. 8, p. 2645-54, 2009.

TAKASHIMA, M.; HORIE, M.; SHICHIRI, M.; HAGIHARA, Y.; YOSHIDA, Y.; NIKI, E. Assessment of antioxidant capacity for



scavenging free radicals in vitro: A rational basis and practical application. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 52, p. 1242-1252, 2012.

TOALDO, I. M.; FOGOLARI, O.; PIMENTEL, G. C.; GOIS, J. S.; BORGES, D. L. G.; BORDIGNON-LUIZ, M. 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.

TORMEN, L.; TORRES, D. P.; DITTERT, I. M.; ARAÚJO, R. G. O.; FRESCURA, V. L. A.; CURTIUS, A. J. Rapid assessment of metal contamination in commercial fruit juices by inductively coupled mass spectrometry after a simple dilution. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 24, p. 95-102, 2011.

UENOJO, M; PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. *Química Nova*, v. 30, p. 388-394, 2007.

ULRICH, J. C. Determinação de impurezas em compostos de urânio por meio da técnica de espectrometria de massas de alta resolução com fonte de plasma indutivo (HR-ICPMS). Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Materiais) – IPEN, Universidade de São Paulo, 2001.

UVIBRA. União Brasileira de Vitivinicultura. *Comercialização de vinhos e derivados elaborados de 2010 a 2015 – mercado interno e externo*, 2015a. Disponível em: <[http://www.uvibra.com.br/pdf/comercializacao2010a2015\\_jul.pdf](http://www.uvibra.com.br/pdf/comercializacao2010a2015_jul.pdf)>. Acesso em: 12 out. 2015.

UVIBRA. União Brasileira de Vitivinicultura. *Produção de uvas, elaboração de vinhos e derivados*, 2015b. Disponível em: <[http://www.uvibra.com.br/pdf/safra\\_uva2003-2014.pdf](http://www.uvibra.com.br/pdf/safra_uva2003-2014.pdf)>. Acesso em: 9 ago. 2015.

VAN BREEMEN, R. B.; LI, Y. Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, v. 1, p. 175-85, 2005.

VAN DUYNHOVEN, J. P., VAUGHAN, E. E., JACOBS, M., KEMPERMAN, R. A., VAN VELZEN, E. J., GROSS, G. Microbes and health sackler colloquium: metabolic fate of polyphenols in the human superorganism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 108, p. 4531-4538, 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.

VINSON, J. A.; TEUFEL, K.; WU, N. Red wine, dealcoholized red wine, and especially grape juice, inhibit atherosclerosis in a hamster model. *Atherosclerosis*, v. 156, p. 67-72, 2001.

VOLF, I.; POPA, V. I. The obtaining of active compounds with antioxidant properties from vegetable by-products. Study of the extraction process of polyphenolic compounds from *Vitis* sp. wood. *Revista de Chimie*, v. 55, p. 707-710, 2004.

WHITAKER, J. Enzymes. In: FENNEMA, O. R. (Ed.). *Food Chemistry*. 3 ed. New York: Marcel Dekker, 1996. p. 431-530.

XU, J. W.; IKEDA, K.; YAMORI, Y. Inhibitory effect of polyphenol cyanidin on TNF- $\alpha$ -induced apoptosis through multiple signaling pathways in endothelial cells. *Atherosclerosis*, v. 193, p. 299-308, 2007.

## APÊNDICES

**APÊNDICE A** – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. (Estudo Clínico de Intervenção em Seres Humanos)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA  
CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
DE ALIMENTOS

### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Resolução nº 196, de 10 de outubro de 1996, segundo Conselho  
Nacional de Saúde.

(Estudo Clínico de Intervenção em Seres Humanos)

**Título da pesquisa:** Perfil fenólico e sensorial e avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* de sucos de uva *Vitis labrusca* L.

**População de estudo:** voluntários sadios selecionados dentro da comunidade universitária (estudantes, professores e funcionários) da Universidade Federal de Santa Catarina.

**Objetivo da pesquisa:** avaliar a atividade antioxidante sérica e o efeito sobre a oxidação lipídica em indivíduos saudáveis após o consumo de sucos de uva *Vitis labrusca* L.

### **Participação na pesquisa:**

De modo a verificar o efeito agudo *in vivo* do consumo de sucos de uva, você será solicitado a ingerir amostras de suco de uva *Vitis labrusca* L. e serão realizadas coletas de amostras de sangue através de punção venosa, realizada de forma asséptica e com material descartável, por profissional habilitado, para análise da atividade antioxidante sérica e da oxidação lipídica. O estudo será dividido em três fases, com três intervenções, contemplando duas amostras de suco de uva *Vitis labrusca* L. e uma amostra controle (água). Você será solicitado a abster-se do consumo de alimentos e bebidas ricos em antioxidantes, como frutas e verduras, chocolate, mel, refrigerantes, café e chás, além de bebidas alcoólicas durante as 72 horas antecedentes às intervenções e coletas do

estudo. No primeiro dia experimental, após jejum de 12 horas, será coletada uma amostra de sangue venoso periférico. Em seguida, você receberá e consumirá a amostra de suco e permanecerá sem ingerir alimentos, até a segunda coleta 1 hora após o consumo do suco. O experimento será repetido com as outras amostras após um intervalo de 15 dias entre as intervenções, totalizando o período de 30 dias do estudo. Você poderá retornar a sua alimentação habitual durante o intervalo de duas semanas entre cada dia experimental, mantendo a restrição alimentar quanto a fontes de antioxidantes nas 72 horas antecedentes ao próximo experimento. Você será solicitado a preencher um recordatório de refeições diárias, informando o horário e a composição de suas refeições durante os três dias precedentes às intervenções e coletas sanguíneas.

**Riscos:** os riscos envolvem o procedimento de coleta sanguínea, podendo ocorrer desconforto, tontura e mal estar, e hematomas posteriores relacionados à punção venosa por agulha. Em caso de qualquer sintoma de mal estar, o procedimento será suspenso, e o voluntário será submetido ao repouso para verificação dos sinais vitais de pressão arterial, frequência cardíaca e respiratória, e temperatura corporal, por profissional habilitado na área da saúde. O voluntário poderá ser encaminhado à unidade competente de saúde desta Instituição para realização das medidas terapêuticas necessárias e acompanhamento clínico até o estabelecimento das condições normais.

**Benefícios:** as informações obtidas nesta pesquisa permitirão avaliar o potencial bioativo de sucos de uva na proteção quanto às reações de oxidação em células sanguíneas humanas, com impacto direto na saúde do consumidor.

**Compensações:** você receberá gratuitamente um lanche após cada coleta sanguínea diária. A sua participação no projeto tem caráter voluntário e todos os procedimentos serão realizados sem qualquer tipo de ônus ou remuneração ao voluntário. Após a conclusão da fase experimental, os voluntários serão informados quanto aos principais resultados.

**Confabilidade:** Será garantido o total sigilo concernente à sua participação nesta pesquisa. Os resultados poderão ser divulgados em publicações, congressos e trabalhos científicos, porém sem a identificação do voluntário.

**Direito de recusa ou desistência:** você poderá desistir de participar desta pesquisa em qualquer momento, sem que isso lhe traga qualquer prejuízo ou penalização, sem necessidade de justificativa.

**Desde já agradecemos sua colaboração. Maiores informações:**

**Pesquisadores responsáveis:**

Doutoranda em Ciência dos Alimentos (CAL/UFSC): Isabela Maia Toaldo

Telefone: (48) 8431-3879 e-mail: bela.toaldo@gmail.com

Coordenadora-Chefe: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marilde Bordignon-Luiz

Laboratório de Bioquímica de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina  
Rod. Admar Gonzaga, 1346, CEP: 88034-001, Itacorubi,  
Florianópolis/SC, Brasil.

Telefone: (48) 3721-5376 e-mail: marilde.bordignon@ufsc.br

**Colaborador:**

Eu, voluntário saudável, declaro estar ciente do compromisso assumido nesta pesquisa e declaro meu desejo de participar da mesma. Declaro também que recebi uma cópia do presente termo.

Florianópolis, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2013

Nome do voluntário:

Sexo: M ( ) F ( )

RG: \_\_\_\_\_

Data de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Telefone(s): \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Cidade: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do voluntário

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador



## ANEXOS

### ANEXO A – Parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA CATARINA - UFSC



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Perfil fenólico e sensorial e avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo de sucos de uva *Vitis labrusca* L.

**Pesquisador:** Marilde Terezinha Bordignon Luiz

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 12703013.3.0000.0121

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Santa Catarina

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 249.404

**Data da Relatoria:** 08/04/2013

##### Apresentação do Projeto:

Trata-se de resposta a pendência do projeto de tese de doutorado vinculado ao programa de pós-graduação do DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS e que pretende realizar a caracterização fenólica e sensorial de sucos de uva *Vitis labrusca* L. e a avaliação da oxidação lipídica e atividade antioxidante in vivo.

##### Objetivo da Pesquisa:

Caracterizar e avaliar o perfil fenólico e sensorial, e a atividade antioxidante in vivo de sucos de uva *Vitis labrusca* L. da Região da Serra Gaúcha, Sul do Brasil.

##### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

os pesquisadores apontam como benefícios: "a interdisciplinaridade do trabalho, envolvendo a caracterização fenólica e sensorial para o reconhecimento e elucidação de identidade e características típicas, e o estudo das propriedades biológicas em seres humanos, com efeitos benéficos à saúde pública. Os resultados visam, portanto, um impacto efetivo no reconhecimento e desenvolvimento da vitivinicultura brasileira, motivando a expansão da comercialização e consumo de suco de uva, como um alimento tipicamente natural e nutritivo. Como riscos os pesquisadores apontam: "em caráter técnico, a disponibilidade de amostras, reagentes e equipamentos, bem como possíveis erros ou imprevistos durante os procedimentos analíticos. Na pesquisa com seres humanos, a desistência ou o não cumprimento das recomendações do estudo

**Endereço:** Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima  
**Bairro:** Trindade **CEP:** 88.040-900  
**UF:** SC **Município:** FLORIANOPOLIS  
**Telefone:** (48)3721-9206 **Fax:** (48)3721-9696 **E-mail:** cep@reitoria.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA CATARINA - UFSC



podem causar adversidades à pesquisa. Todavia, essas adversidades devem ser corrigidas e minimizadas ao longo do trabalho." Após revisão solicitada pelo CEP houve a inclusão dos riscos pertinentes aos procedimentos invasivos para coleta de sangue de parte dos sujeitos da pesquisa.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

os pesquisadores atenderam as solicitações do CEP elaboradas no parecer anterior

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

após readequação solicitada pelo CEP está adequada.

**Recomendações:**

sem recomendações

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

aprovado

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

FLORIANOPOLIS, 18 de Abril de 2013

---

Assinador por:  
**Washington Portela de Souza**  
(Coordenador)

Endereço: Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima  
Bairro: Trindade CEP: 88.040-900  
UF: SC Município: FLORIANOPOLIS  
Telefone: (48)3721-9206 Fax: (48)3721-9696 E-mail: cep@reitoria.ufsc.br



**ANEXO B** – Comprovante de participação e apresentação do trabalho “*Elemental analysis and characterization of brazilian grape juices from Vitis labrusca L. by ICP-MS*” no Winter Conference on Plasma Spectrochemistry 2014, Amelia Island, Estados Unidos.

**Certificate of Attendance**  
**2014 Winter Conference on**  
**Plasma Spectrochemistry**  
*Amelia Island, Florida, January 6 – 11, 2014*

This certifies that

**Isabela Maia Toaldo**

Attended and presented a poster (FP03) in the  
2014 Winter Conference on Plasma Spectrochemistry  
in Amelia Island, Florida, January 6 – 11, 2014

Ramon M. Barnes & Conference Chairman  
2014 Winter Conference on Plasma Spectrochemistry, %ICP Information Newsletter, Inc.  
P.O. Box 666, Hadley, MA 01035-0666

18241 Beauty Berry Court, Lehigh Acres, FL 33972-7525

Dr. Ramon Barnes, Telephone (239) 674-9430, FAX (239) 674-9431, wc2014@chem.umass.edu, <http://icpinformation.org>

*January 6, 2014*

**ANEXO C** – Comprovante de participação e apresentação oral do trabalho “*Bioavailability and metabolism of grape trans-resveratrol on Caco-2 cells*” no 20th National Symposium for Applied Biological Sciences, Louvain-la-Neuve, Bélgica.



### Certificate

This document certifies that *Isabela Maia Toaldo* has given an oral presentation during the 20th National Symposium of Applied Biological Sciences, January 30, 2015.

The title of the communication was :

*“Bioavailability and metabolism of grape trans-resveratrol on Caco-2 cells”.*

A handwritten signature in black ink, appearing to read "X. Draye".

Prof. Xavier DRAYE  
On behalf of the organizing committee

**ANEXO D** – Comprovante de participação e apresentação oral do trabalho “*Bioactivity of malvidin 3,5-diglucoside on endothelial cells as evidence of the antioxidant potential of V. labrusca L. grape juices*” no 5th Annual BNS Congress – Adding Value to Nutrition research, Brussels, Bélgica.



## **Certificate of attendance**

**5th Annual BNS Congress**

**Adding Value to Nutrition research**

To whom it may concern

As President of the organising committee and board member of the Belgian Nutrition society, I hereby certify that

**Isabela Maia Toaldo**

---

Attended the conference “Adding value to nutrition research” on April 3 2015 and contributed with an oral presentation “*Bioactivity of malvidin 3,5-diglucoside on endothelial cells as evidence of the antioxidant potential of V. labrusca L. grape juices*”. This is a scientific national conference.

Brussels 3/04/2015

Prof C. Lachat


---

**Belgian Nutrition Society**

[www.belgiannutritionssociety.be](http://www.belgiannutritionssociety.be) contact [Info@belgiannutritionssociety.be](mailto:Info@belgiannutritionssociety.be)

---

## ANEXO E – Ficha técnica da enzima comercial Everzym Color (Everintec, Itália).



**EVERINTEC**

**EVERZYM COLOR**  
Pectolytic Enzyme for Red Wines of Quality

**CHARACTERISTICS AND APPLICATIONS**

EVERZYM COLOR is a granular enzymatic preparation with pectolytic activity and with secondary cellulase, hemicellulase, protease and  $\beta$ -glucanase activities.

EVERZYM COLOR thanks to this mix of enzymatic activities is used:

- ⇒ In red grape mash for the extraction of colour from the skins;
- ⇒ In musts-wines where its action allows for a greater usage of the tanks volume, thanks to a reduction of the foaming, and the facilitation of the alcoholic fermentation and MLF; it also accelerates the clarification and increases the filtration yield
- ⇒ During the fermentation, where it accelerates the lysis of the yeast and from which mannoproteins, nucleoside, nucleotide and polysaccharide are released. These are useful for the stability and sensorial improvement of the wine.
- ⇒ For the elaboration of "Nouveau" style wines where it allows for a lower use of bentonite and improves filterability.
- ⇒ For musts and sulfited musts used for the production of concentrates, where it eliminates foam problems, also during their desulfitation process
- ⇒ For the regeneration of microfiltration cartridges or in crossflow filtration systems or of reverse osmosis systems, before the chemical treatment (see protocol)

EVERZYM COLOR has a naturally very low level of cinnamyl-esterase and anthocyanase activity. EVERZYM COLOR is produced according to the European Directive EU 98/81/EC and does not contain any Genetically Modified Organisms.


**INSTRUCTIONS FOR USE**

Dose: 1 – 5 g/hL of EVERZYM COLOR in the mash, must, or wine  
Dissolve EVERZYM COLOR preferably in cold and chlorine free water, in a clean container and in a ratio of 1:10.  
The enzymatic solution prepared in this manner is stable for a maximum of 24 hrs if stored properly and can be used with dosing pumps.  
Add EVERZYM COLOR to the mash or to the first hectoliters of must or wine during the filling of the tank to be treated with enzymes.

**PACKING**

250 g sachets, 1 kg and 10 kg bags.  
It is recommended to store EVERZYM COLOR at a temperature between 5 and 15 °C

**This product is not considered dangerous therefore a material safety data sheet is not necessary.**




Attestato certificato ISO 9001:2000  
conformità C/026041

EVER srl - Via Pacinotti, 37 - Pramaggiore (VE) Italy - Tel. +39 0421 200455 - ever@ever.it - www.ever.it

SCHEDE TECNICHE REV. 03\_15/05/08

## ANEXO F – Ficha técnica da enzima comercial Rapidase Smart (DSM, Holanda).

DSM Food Specialties - Beverage Ingredients 

P.O. Box 1,  
2600 MA Delft, The Netherlands  
PHONE +31 15 2794001, FAX +31 15 2794020

APPLICATION DATA SHEET

### RAPIDASE<sup>®</sup> SMART

**Powerful pectinase for apple juice extraction with press**

#### PRODUCT DESCRIPTION

RAPIDASE<sup>®</sup> SMART is a liquid pectinase from self-cloned *Aspergillus niger*.

#### FUNCTION

RAPIDASE<sup>®</sup> SMART is a new generation of pectinases, specially developed for mash treatment and optimal juice extraction from apple. This new combination of pectinases increases the yield and capacity of equipment, with faster degradation of the soluble pectin, resulting in lower viscosity of the mash, higher free run juice volume and better pressability.

RAPIDASE<sup>®</sup> SMART contains the right balance of specific pectinases required for apple juice extraction.

#### APPLICATION

RAPIDASE<sup>®</sup> SMART is easy to use. It must be added during fruit crushing with a metering pump. Just before use, to ensure adequate mixing, it should be diluted in 10 to 20 times its volume of water (see dosage in the table below).

After extraction, depectinisation of juice is still necessary with RAPIDASE<sup>®</sup>C80 MAX at 2 g/hl and starch hydrolysis with HAZYME<sup>®</sup> DCL at 2 g/hl (for juice at 13° brlx).

Active from: 10 to 50°C - PH 3.0 to 4.5

application	dosage	recommendation
Beginning of processing season	50-100 g/ton of apples	30-60 min at room T°
End of processing season	100-150 g/ton	30-60 min at room T°

#### TECHNICAL SERVICE

Please contact your local DSM Food Specialties technical sales representative to receive additional information on meeting your needs.

*Although diligent care has been used to ensure that the information provided herein is accurate, nothing contained herein can be construed to imply any representation or warranty as to the accuracy, currency or completeness of this information. The content of this document is subject to change without further notice. This document is non-controlled and will not be automatically replaced when changed. Please contact us for the latest version of this document or further information.*