



XXI ENCONTRO NACIONAL E
VII CONGRESSO LATINO AMERICANO DE ANALISTAS DE ALIMENTOS
CADEIA PRODUTIVA E SEGURANÇA ALIMENTAR: DESAFIOS E ESTRATÉGIAS
26 A 30 DE MAIO DE 2019
CENTRO DE CONVENÇÕES CENTRO SUL | FLORIANÓPOLIS | SC | BRASIL



POTENCIAL BIOATIVO DO RESÍDUO OBTIDO DO PROCESSAMENTO DO SUCO DE UVA (*Vitis labrusca* L.) E SEU EFEITO CITOTÓXICO EM CÉLULAS DE CÂNCER COLORRETAL

Isabel da Silva Haas, Trilicia Margarida Gomes, Isabela Maia Toaldo, Márcia Goettert, Marilde T. Bordignon-Luiz - UFSC [Florianópolis - SC - Brasil]

Introdução

A geração de resíduos provenientes da vitivinicultura vem crescendo nos últimos anos, fato relacionado com o aumento da produção de vinhos e sucos. Durante a elaboração do suco de uva, na etapa de maceração, os compostos fenólicos são transferidos para o mosto, no entanto, grande parte destes compostos ainda permanece nos tecidos vegetais. O consumo de alimentos ricos em polifenóis está associado à prevenção de várias patologias crônicas, incluindo doenças carcinogênicas. A capacidade dos compostos fenólicos em exercer ações benéficas está estritamente relacionada à sua bioacessibilidade e consequente biodisponibilidade. Avaliar as possíveis transformações químicas que os compostos fenólicos podem sofrer durante a digestão é importante para entender seus efeitos biológicos. Portanto o objetivo deste estudo foi avaliar a composição fenólica do resíduo de uva Bordô e Isabel, o efeito da digestão *in vitro* na concentração de fenólicos e sua atividade citotóxica em células de câncer colorretal (Caco-2).

Material e métodos

Amostras

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

Digestão *in vitro*

A digestão *in vitro* do resíduo de uva Bordô e Isabel foi realizada conforme descrito por Minekus et al., 2014. Este método de digestão consiste em três fases principais, a fase oral (α -amilase), gástrica (pepsina) e intestinal (pancreatina). No final de cada fase de digestão, a parte líquida foi recolhida,



XXI ENCONTRO NACIONAL E
VII CONGRESSO LATINO AMERICANO DE ANALISTAS DE ALIMENTOS
CADEIA PRODUTIVA E SEGURANÇA ALIMENTAR: DESAFIOS E ESTRATÉGIAS
26 A 30 DE MAIO DE 2019
CENTRO DE CONVENÇÕES CENTRO SUL | FLORIANÓPOLIS | SC | BRASIL



centrifugada a 4000 rpm durante 10 min e o sobrenadante foi utilizado como amostra digerida.

Análises espectrofotométricas

As análises quanto à composição fenólica e capacidade antioxidante foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis (Hitachi U 2010, CA, EUA). O teor de polifenóis totais foi determinado de acordo com o método de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton e Rossi (1965). As antocianinas monoméricas totais foram quantificadas utilizando o método do pH diferencial descrito por Giusti e Wrolstad (2001). Os flavanóis totais foram determinados pelo método DMACA (*p*-dimetilaminocinmaldeído) descrito por Arnous, Makris e Kefalas (2002). Os taninos condensados foram determinados pelo método de HCl-butanol (v/v) descrito por Porter et al. (1986). Os resultados foram expressos em mg/kg base seca. A capacidade antioxidante das amostras foram avaliadas utilizando o método ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-ácido sulfônico) como descrito por Re et al. (1999). Os resultados de capacidade antioxidante foram expressos (base seca) em equivalente Trolox (TEAC) ($\mu\text{mol/g}$).

Linhagem celular

Células de adenocarcinoma colorretal (Caco-2) foram adquiridas no banco de células do Rio de Janeiro. A linhagem celular Caco-2 foi cultivada em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium)-Low Glucose (Sigma-Aldrich), 10 % soro bovino fetal e 1 % de aminoácidos. As células Caco-2 (20-25^o passagem) foram plaqueadas em placas de 96 poços com densidade de $3,0 \times 10^3$ e incubadas a 37°C em estufa com atmosfera umidificada, contendo 5% de CO₂. Os tratamentos foram adicionados após 24 horas de adesão celular e mantidos por 48 horas para posterior avaliação da viabilidade celular.

Atividade citotóxica

Os resíduos de uva Bordô e Isabel (EB e EI) foram extraídos com DMSO (dimetilsulfóxido). Os tratamentos com as amostras digeridas (EB e EI) e não digeridas foi realizado na concentração de 500 $\mu\text{g/ml}$. A atividade citotóxica do resíduo de uva Bordô e Isabel e das suas frações digeridas (fase gástrica e intestinal) foram avaliadas pelo ensaio de MTT (brometo de 3-[4, 5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio), este método mede a taxa de proliferação celular. Após o plaqueamento da linhagem celular (24 horas) o tratamento com as amostras foi realizado (48 horas) descartando o sobrenadante e adicionando 200 μL do corante MTT (5 mg/mL, Sigma) dissolvido em meio, após 3 horas, o meio foi retirado e 200 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados para a solubilização dos cristais de formazan. A absorbância das amostras foi medida pelo leitor ELISA "Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay" (SpectraMax i3®) a 570 nm. A viabilidade celular foi calculada usando a equação 1:

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



XXI ENCONTRO NACIONAL E
VII CONGRESSO LATINO AMERICANO DE ANALISTAS DE ALIMENTOS
CADEIA PRODUTIVA E SEGURANÇA ALIMENTAR: DESAFIOS E ESTRATÉGIAS
26 A 30 DE MAIO DE 2019
CENTRO DE CONVENÇÕES CENTRO SUL | FLORIANÓPOLIS | SC | BRASIL



A_a é a absorbância das células após tratamento com a amostra e A_c é a absorbância do controle (sem adição de amostras).

Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada pelo programa STATISTICA v. 6.0 (2001) (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) e GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc). A significância estatística foi avaliada usando análise de variância ANOVA seguida pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Todas as análises foram realizadas em triplicatas e os resultados expressos como média \pm desvio padrão.

Resultados e discussão

A composição fenólica do resíduo de uva Bordô e Isabel estão apresentadas na Tabela 1. O resíduo de uva Bordô apresentou maiores concentrações para todas as classes de compostos fenólicos. A concentração de polifenóis totais no resíduo de uva Bordô e Isabel foi de 14910 e 6381 mg/kg, respectivamente, a variedade Bordô apresentou concentração 57% maior de polifenóis totais. O resíduo de uva Bordô apresentou maior concentração de antocianinas monoméricas totais. A variedade Bordô já é conhecida por apresentar maior concentração de antocianinas do que as demais variedades *Vitis labrusca* L., fato que contribui para a utilização desta variedade em blends de sucos com coloração menos intensa.

A concentração de taninos condensados nos resíduos de uva Bordô e Isabel foi de 5633 e 3784 mg/kg respectivamente. Os taninos condensados são responsáveis pelas características de adstringência nos alimentos e podem apresentar efeitos antinutricionais ao serem inseridos na dieta. Diversas variáveis tendem a influenciar e modificar os efeitos antinutricionais dos taninos, o que dificulta estabelecer uma concentração ideal de ingestão. O resíduo de uva Bordô apresentou maior capacidade antioxidante (55 $\mu\text{mol/g}$) que o resíduo de uva Isabel (39 $\mu\text{mol/g}$).

Tabela 1. Composição fenólica (mg/kg b.s) do resíduo de uva Bordô e Isabel (*Vitis labrusca* L.).

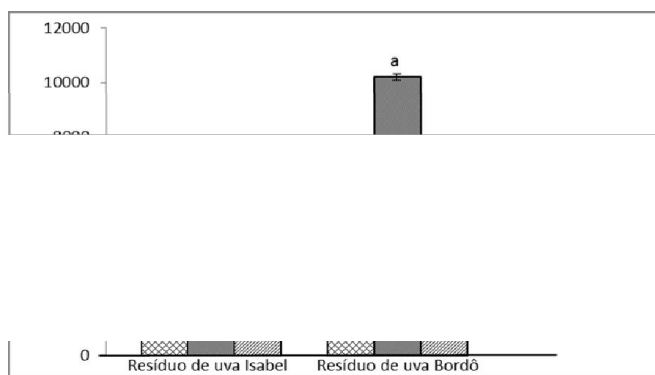
Análises	EB	EI
Polifenóis totais	14910 ^a \pm 2,5	6381 ^b \pm 2,9
Flavonóis totais	1951 ^a \pm 1,3	1016 ^b \pm 2,4
Antocianinas monoméricas totais	8080 ^a \pm 3,5	1497 ^b \pm 2,9
Taninos condensados	5633 ^a \pm 1,5	3784 ^b \pm 2,4
ABTS (TEAC $\mu\text{mol/g}$)	55 ^a \pm 0,02	39 ^b \pm 0,8

Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão (n=3). Letras diferentes entre colunas representam diferença significativa entre os resíduos de diferentes variedades. EB: extrato de resíduo Bordô; EI: extrato de resíduo Isabel.

A concentração de polifenóis totais no resíduo de uva da variedade Bordô e Isabel em diferentes fases de digestão *in vitro* estão apresentadas na Figura 1. O resíduo de uva Bordô e Isabel apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) na concentração de polifenóis totais entre a fase oral e gástrica, o que pode ser indicativo de degradação ou mudanças estruturais destes compostos

ao longo destas fases de digestão. O resíduo de uva Isabel apresentou menor concentração de polifenóis totais na fase oral (1962 mg/kg b.s) do que na fase gástrica e intestinal (5104 e 5272 mg/kg b.s). O mesmo comportamento foi evidenciado para o resíduo de uva Bordô. Após a digestão do resíduo de uva Isabel, a concentração de polifenóis totais não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) entre a fase gástrica e intestinal. Já ao realizar a digestão do resíduo de uva Bordô, houve uma redução significativa ($p < 0,05$) na concentração de polifenóis totais entre as fases gástrica e intestinal, sugerindo que estes compostos são mais estáveis em pH ácido.

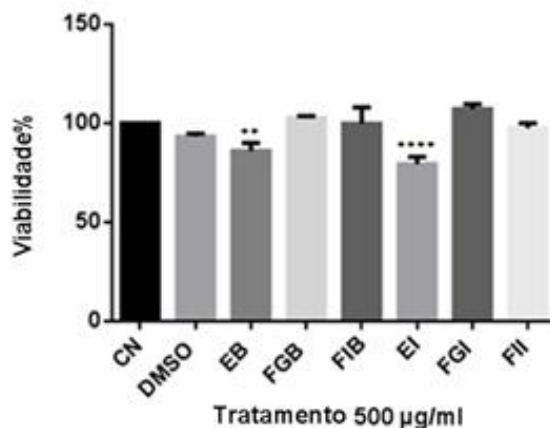
Figura 1- Polifenóis totais (mg/kg b.s) do resíduo de uva Bordô e Isabel (*Vitis labrusca* L.) durante a simulação gastrointestinal.



Os resultados são a média \pm desvio padrão. Letras diferentes entre as fases de digestão do resíduo de mesma variedade indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

A viabilidade celular da linhagem Caco-2 após o tratamento com o resíduo de uva e as frações digeridas está apresentada na Figura 2. O tratamento da linhagem Caco-2 foi realizado com o resíduo de uva Bordô e Isabel (EB e EI) e a viabilidade celular foi de 86,04 e 79,38%, respectivamente. As frações digeridas não apresentaram ação antiproliferativa sobre as células de adenocarcinoma do cólon (Caco-2). Estes resultados sugerem que o resíduo de uva promoveu uma maior ação citotóxica sob as células Caco-2 do que o resíduo de uva digerido, o que pode estar relacionado com a maior concentração de fenólicos nas amostras EB e EI (não digeridas) em comparação às amostras digeridas (oral, gástrica e intestinal).

Figura 2. Efeito do tratamento com as amostras de resíduo de uva Bordô e Isabel e as frações digeridas frente às células Caco-2. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão. Para o controle (CN) foi atribuído um valor de 100%.



*Representa diferença significativa ($p < 0,05$) no tratamento com as amostras em relação ao controle. CN, controle negativo; DMSO, dimetilsulfóxido; EB, extrato de resíduo Bordô; FGB, fase gástrica Bordô; FIB, fase intestinal Bordô; EI, extrato de resíduo Isabel; FGI, fase gástrica Isabel; FII, fase intestinal Isabel.

Conclusão

A variedade de uva influenciou na composição fenólica dos resíduos. Os resíduos de uva submetidos à simulação gastrointestinal apresentaram menor concentração de compostos bioativos. Os resíduos de uva Isabel e Bordô inibiram a proliferação de células de adenocarcinoma do cólon, no entanto após a digestão *in vitro* os resíduos de uva não apresentaram efeito citotóxico na linhagem de câncer de cólon. Os resultados sugerem que este resíduo apresenta potencial para ser aplicado no desenvolvimento de novos produtos, no entanto maiores estudos são necessários para avaliar o potencial biológico desta matriz após a simulação gastrointestinal.

Referências

- 1- ARNOUS, A.; MAKRIS, D.; KEFALAS, P. Correlation of pigment and flavanol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 15, p. 655 – 665, 2002.
- 2- GIUSTI, M.M., WROLSTAD, R.E., 2001. Anthocyanins: characterization and measurement with UV-visible spectroscopy. In: Wrolstad, RE (ed) *Current protocols in food analytical chemistry*, 1st edn. Wiley, New York, F1.2.1–F1.2.13.
- 3- HAAS, I.C.S., TOALDO, I.M., DE GOIS, J.S., BORGES, D.L.G., PETKOWICZ, C.L.O., BORDIGNON-LUIZ, M.T. Phytochemicals, Monosaccharides and Elemental Composition of the Non-Pomace Constituent



of Organic and Conventional Grape Juices (*Vitis labrusca* L.): Effect of Drying on the Bioactive Content. *Plant Foods for Human Nutrition*, v. 71, p. 422-428, 2016.

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

5- PORTER, L.J.; HRSTICH, L.N.; CHAN, B.G. The conversion of procyanidins and prodelfinidins to cyaniding and delphinidin. *Phytochemistry*, v. 1, v. 25, p. 223-230, 1986.

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

7- SINGLETON, V.L., ROSSI, J.A., 1965. Colourimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent. *Am. J. Enol. Vitic.* 16, 144–158.