



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CRISTIANA FÁTIMA GONZAGA DA SILVA

**OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO DO RESÍDUO
AGROINDUSTRIAL DA CASCA DA UVA (*Vitis labrusca*):
identificação dos compostos bioativos e avaliação do
potencial antioxidante e anti-inflamatório**

Londrina
2017

CRISTIANA FÁTIMA GONZAGA DA SILVA

**OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO DO RESÍDUO
AGROINDUSTRIAL DA CASCA DA UVA (*Vitis labrusca*):
identificação dos compostos bioativos e avaliação do
potencial antioxidante e anti-inflamatório**

Dissertação de mestrado apresentada ao Departamento de Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do Título de MESTRE em Química.

Orientador: Prof. Dr. Nilton Syogo Arakawa

Londrina
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

S586o Silva, Cristina Fátima Gonzaga.

Obtenção do extrato bruto do resíduo agroindustrial da casca da uva (*Vitis labrusca*): identificação dos compostos bioativos e avaliação do potencial antioxidante e anti-inflamatório / Cristiana Fátima Gonzaga Silva. - Londrina, 2017.
98 f. : il.

Orientador: Nilton Syogo Arakawa.

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2017.
Inclui bibliografia.

1. *Vitis labrusca* - Tese. 2. Atividade Antioxidante – Teses. 3. Inflamação – Teses. 4. ESI-MS-MS – Teses. 5. Cafeeiro – Efeito da radiação – Teses. 6. Metabolômica – Teses. I. Arakawa, Nilton Syogo. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDU 547.9

CRISTIANA FÁTIMA GONZAGA DA SILVA

**OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO DO RESÍDUO AGROINDUSTRIAL
DA CASCA DA UVA (*Vitis labrusca*): identificação dos compostos
bioativos e avaliação do potencial antioxidante e anti-inflamatório**

Dissertação de mestrado apresentada ao Departamento de Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do Título de MESTRE em Química.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Nilton Syogo Arakawa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dra. Marcela Maria Baracat
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Sandra Regina Georgetti
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 10 de fevereiro de 2017.

Dedico este trabalho aos meus pais,
Antônio Fernando e Maria da Graça, e
a minha irmã Tatiana Gonzaga.

AGRADECIMENTOS

À minha família por todo o apoio durante minha vida acadêmica.

Agradeço ao meu orientador, Prof.º Dr. Nilton Syogo Arakawa, não só pela constante orientação neste trabalho, mas sobretudo pela sua amizade.

Aos professores Prof.º Dr. Eduardo César Meurer, Prof.º Dr. Waldiceu Aparecido Verri Júnior, Profª. Dra. Sandra Regina Georgetti pela oportunidade de realizar os experimentos em seus laboratórios.

Aos colegas que me auxiliaram nas análises Dr. Marcos Alessandro dos Santos Ribeiro, Ms. Victor Fattori, Tecgº. Caroline da Rocha Tonetti.

Aos meus amigos pelo apoio e compreensão nos momentos difíceis, Agerdânio Andrade Souza, Any Caroliny Almeida Pavão, Caroline da Rocha Tonetti, Paula Rivero e Tatiana Ap. Gonzaga da Silva.

Gostaria de agradecer também algumas pessoas que contribuíram de forma direta ou indiretamente para a conclusão desse trabalho: Fabio Antônio Cajamarca, Andres Lancheros, Jakeline Márcia dos Santos, Rogers Nabeyama Michels, Gustavo Galo, Gallileu Malta e muitas outras.

À Capes pela concessão da bolsa e auxílio financeiro.

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu,
mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre
aquilo que todo mundo vê.”*

(Arthur Schopenhauer)

SILVA, Cristiana Fátima Gonzaga. **Obtenção do extrato bruto do resíduo agroindustrial da casca da uva (*Vitis labrusca*):** identificação dos compostos bioativos e avaliação do potencial antioxidante e anti-inflamatório. 2017. 98 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

O setor vinícola tem enfrentado diversos problemas associados à biomassa residual da uva, utilizada para produção de sucos e vinhos. Essa biomassa residual é rica em compostos bioativos, principalmente compostos fenólicos, com atividades biológicas promissoras, dentre elas atividades antioxidantes, antimicrobiana e anti-inflamatória. O presente trabalho teve como objetivo investigar os principais compostos químicos do resíduo agroindustrial das cascas da uva (*Vitis labrusca*) e avaliar a sua capacidade sequestradora de radical livre *in vitro*, além do seu efeito analgésico e anti-inflamatório em camundongos induzido por carragenina *in vivo*. O resíduo agroindustrial consistia de uma mistura das variedades Isabel e Bordô. Cinco extratos brutos (EtOH 100%, EtOH 70%, EtOH 50%, EtOH 30%, H₂O 100%) todos acidificados com HCl 0,1% (v/v) da casca da *Vitis labrusca* foram obtidos e submetidos às análises: da atividade antioxidante (DPPH e ABTS), determinação de compostos fenólicos (Folin-Ciocalteu) e flavonoides totais, visando determinar o melhor solvente extrator com potencial antioxidante. Dentre os cinco, o extrato EtOH 50% apresentou: DPPH: 147,00 µg.mL⁻¹; ABTS: 27,76 µg.mL⁻¹; Compostos fenólicos: 26,62 mgGAE.g⁻¹ de extrato; Flavonoides totais: 19,15 mgRTE.g⁻¹ de extrato, identificando-se os principais compostos químicos por ESI-MS/MS pela técnica de MRM nos modos positivos e negativos (via infusão direta), indicando a presença da peonidina-3-O-glicosídeo, delphinidina-3-O-glicosídeo, petunidina-3-O-glicosídeo, malvidina-3-O-glicosídeo, além de cianidina-3-O-p-coumaroil-glicosídeo, peonidina-3-O-p-coumaroil-glicosídeo, petunidina-3-O-p-coumaroil-glicosídeo, malvidina-3-O-p-coumaroil-glicosídeo e malvidina-3,7-O-diglicosídeo para o modo positivo, apigenina-7-glicosídeo, luteolina-7-glicosídeo, quercentina-3-galactosídeo, isoramnetina-3-glicosídeo, miricetina-3-rutinosídeo para o modo negativo. O efeito analgésico e anti-inflamatório do extrato bruto EtOH 50% da biomassa vinícola nas doses 30, 100, 300 mg/kg (v.o, 60 min) foi avaliado através de indução por carragenina (100 µg/i.pl) em camundongos. A resposta comportamental foi estimada pela hiperalgesia mecânica, térmica e avaliação do edema nos tempos 0 (basal), 1, 3 e 5 horas após a injeção de estímulo. O recrutamento de neutrófilos foi determinado pela atividade da enzima MPO. O extrato EtOH 50% apresentou efeito analgésico e anti-inflamatório nas doses de 100 e 300 mg/kg. Ambas doses inibiram a hiperalgesia mecânica, hiperalgesia térmica e edema plantar induzidos por carragenina. Além disso, as doses de 100 e 300 mg/kg foram capazes de reduzir o recrutamento de neutrófilos. Portanto, os resultados sugerem que o extrato bruto EtOH 50% da casca da *Vitis labrusca* pode ser uma fonte promissora para tratamentos alternativos anti-inflamatórios, implicando na redução frente aos problemas ambientais de descartes e acúmulo, e será uma nova fonte econômica aos viticultores.

Palavras-chave: *Vitis labrusca*. Atividade Antioxidante. Inflamação. Química Verde. ESI-MS-MS.

SILVA, Cristiana Fátima Gonzaga. **Obtaining crude extract of the agroindustrial waste from grape skin (*Vitis labrusca*):** identification of the bioactive compounds and evaluation of its antioxidant and anti-inflammatory potential. 2017. 98p. Dissertation (Master in Chemistry) - Londrina State University, Londrina, 2017.

ABSTRACT

The wine sector has faced several problems associated with the waste biomass of the grape, used for the production of juices and wines. This residual biomass is rich in bioactive compounds, mainly phenolics with promising biological activities, among them antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory. Herein the present work investigate the main chemical compounds of grape skins agroindustrial waste (*Vitis labrusca*) and evaluate its in vitro free radical scavenging capacity, in addition to its analgesic and anti-inflammatory effect in mice induced by carrageenan. The agroindustrial waste consisted of a mixture of the Isabel and Bordô varieties and only the skins were used. Five crude extracts (100% EtOH, 70% EtOH, 50% EtOH, 30% EtOH, 100% H₂O) acidified with 0.1% (v/v) HCl from *Vitis labrusca* skins were obtained and submitted to antioxidant activity (DPPH and ABTS), phenolic (Folin-Ciocalteu) and total flavonoids determination, to standardized the best solvent extractor with antioxidant potential. The 50% EtOH extract indicated: DPPH: 147.00 µg.mL⁻¹; ABTS: 27.76 µg.mL⁻¹; Phenolic compounds: 26.62 mg GAE.g⁻¹ extract; Total flavonoids: 19.15 mgRTE.g⁻¹ extract. Subsequently, so, this extract was subjected to chemical identification of the compounds by ESI-MS/MS by MRM technique in positive and negative modes (direct infusion), indicating the presence of peonidin-3-O-glycoside, delphinidin- 3-O-glucoside, petunidine-3-O-glycoside, malvidin-3-O-glycoside, in addition to cyanidin-3-O-coumaroyl glycoside, peonidin-3-O-coumaroyl glycoside, petunidine- 3-O-coumaroyl glycoside and malvidin-3,7-O-diglycoside for the positive, apigenin-7-glycoside, luteolin-7-glycoside, quercetin-3-galactoside, isorhamnetin-3-Glycoside, myricetin-3-rutinoside for the negative mode. The analgesic and anti-inflammatory effect of the 50% EtOH crude extract of the wine biomass at doses 30, 100, 300 mg / kg (v.60 min) was evaluated by induction with carrageenan (100 µg/i.pl) in mice. The behavioral response was estimated by mechanical and thermal hyperalgesia and evaluation of edema at time 0 (baseline), 1, 3 and 5 hours after the stimulus injection. Neutrophil recruitment was determined by the activity of the MPO enzyme. The 50% EtOH extract presented analgesic and anti-inflammatory effects at doses of 100 and 300 mg/kg. Both doses inhibited mechanical hyperalgesia, thermal hyperalgesia and plantar edema induced by carrageenan. In addition, doses of 100 and 300 mg/kg were able to reduce neutrophil recruitment. Therefore, the results suggest that the 50% EtOH crude extract from the skins of *Vitis labrusca* may be a promising source for alternative anti-inflammatory treatments, reducing environmental problems of discards and accumulation, and will be a new economic source for winegrowers.

Keywords: *Vitis labrusca*. Antioxidant activity. Inflammation. Green Chemistry. ESI-MS-MS.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	a) Uva Isabel e b) Uva Bordô	20
Figura 2-	Distribuição dos compostos biativos presente na baga da uva	21
Figura 3-	Estruturas químicas dos ácidos fenólicos: a) ácidos benzóicos e b) ácidos cinâmicos	26
Figura 4-	Estruturas dos principais ácidos da fermentação	27
Figura 5-	Fórmula estrutural do <i>trans</i> (a) e <i>cis</i> -resveratrol (b)	28
Figura 6-	Estrutura do composto β -1,2,3,4,6-pentagalactose, para taninos hidrolisáveis	30
Figura 7-	Estruturas principais dos taninos condensados	30
Figura 8-	Estrutura genérica dos flavonoides	31
Figura 9-	Estrutura genérica das principais classes de flavonoides	32
Figura 10-	Estrutura química da antocianina 3-glicosídeo. A posição $R_3 = H$; CH_3CO ; $C_9H_8O_3$; $C_9H_8O_4$	33
Figura 11-	Estrutura química do radical DPPH e reação de estabilização com um antioxidante	41
Figura 12-	Formação do radical ABTS estável com o persulfato de potássio e reação com antioxidante	42
Figura 13-	Componentes principais do espectrômetro de massas	43
Figura 14-	Esquema do analisador quadrupolo	45
Figura 15-	Esquema de funcionamento de múltiplas reações monitoradas em um espectrômetro de massa triplo-quadrupolo	45
Figura 16-	Alga vermelha <i>Chondrus crispus</i> (a) e estrutura química da carragenina λ (b).....	47
Figura 17-	Resumo geral da metodologia empregada para o extrato bruto da casca da <i>Vitis labrusca</i>	50
Figura 18-	Inibição percentual da atividade antioxidante <i>in vitro</i> do extrato bruto para os cinco solventes extratores utilizados na <i>Vitis labrusca</i>	58
Figura 19-	Capacidade antioxidante dos extratos bruto da <i>Vitis labrusca</i> para diferentes percentuais de água e etanol frente ao radical livre ABTS•	60

- Figura 20-** Quantificação dos compostos fenólicos totais para os cinco extratos bruto da casca da *Vitis labrusca*. Resultados expressos (no eixo y) em mg equivalentes de ácido gálico por grama de extrato (mg GAE⁻¹).....61
- Figura 21-** Quantificação flavonoides totais para os cinco extratos bruto da casca da *Vitis labrusca*. Resultados expressos (no eixo y) em mg equivalentes de rutina por grama de extrato (mgRTE⁻¹)62
- Figura 22-** Extrato hidroalcoólico (1:1) bruto da casca da *Vitis labrusca* reduz hiperalgesia mecânica, hiperalgesia térmica, edema plantar e recrutamento de neutrófilos induzidos por carragenina. O animais foram pré-tradados (1h) com as doses de 30, 100 e 300 mg/kg de *Vitis labrusca*. Após isso, os animais receberam estímulo com carragenina (100 µg/animal, i.pl.). A hiperalgesia mecânica (A), hiperalgesia térmica (B), edema plantar (C), e atividade da MPO (D) foram avaliados 1, 3 e 5 horas após a injeção de estímulo carragenina. Resultados expressos em média ± erro padrão da média ($n = 6$ por grupo experimental). * $p < 0,05$ vs. grupo salina. # $p < 0,05$ vs. grupo carragenina.67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Potencial de atividade farmacológica do gênero <i>Vitis</i>	24
Tabela 2-	Principais substituintes das antocianinas	33
Tabela 3-	Dados de MRM para o extrato hidroetanólico (1:1, v/v) bruto da casca da <i>Vitis labrusca</i>	64
Tabela 4-	Dados de MS/MS para as antocianinas presente no extrato da <i>Vitis labrusca</i>	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazoleína)-6-ácido sulfônico
AH	Antioxidante Doador de Hidrogênio
AINE	Anti-Inflamatórios Não Esteroidais
ASC	Ascorbato
CAT	Catalase
CCR1	Receptor de Quimiocina Carbono-Carbono 1
CCR2	Receptor de Quimiocina Carbono-Carbono 2
CCR5	Receptor de Quimiocina Carbono-Carbono 5
CETP	Proteína De Transferência De Colesterol Esterificado
CG/MS	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
CX3XR1	Receptor de Quimiocina Carbono- 3 Aminoácido-Carbono1
CXCL1	Ligante de Quimiocina Carbono-Aminoácido-Carbono 1
CXCR3	Receptor de Quimiocina Carbono-Aminoácido-Carbono 3
CXR3	Receptor de Quimiocina Carbono-Aminoácido 3
CXR4	Receptor de Quimiocina Carbono-Aminoácido 4
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERRO	Espécies Reativas de Oxigênio
ESI	Eletrospray
ESI-tandem-MS	Espectrometria de Massas por Ionização Eletrospray em modo sequencial
EtOH	Etanol
GSH	Glutathiona Reduzida
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HepG2	Células Hepáticas
i.pl	Intraplantar
IASP	Associação Internacional de Estudo de Dor
IC₅₀	Concentração Inibitória em 50%
IL-1	Interleucina 1

IL-10	Interleucina 10
IL-13	Interleucina 13
IL-1β	Interleucina 1 Beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
<i>m/z</i>	Razão massa carga
MadCAM-1	Molécula de Adesão Intestinal
mgGAE	Miligramas Equivalentes De Ácido Gálico
mgRTE	Miligramas Equivalentes De Rutina
MPO	Mieloperoxidase
MRM	Múltiplas Reações Monitoradas
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Reduzido
Nav1,8	Canal de Sódio Controlado por Voltagem Alfa VIII
NF-κB	Fator Nuclear Kappa B
Nm	Nanômetros
PGE2	Prostaglandina E2
pH	Potencial Hidrogeniônico
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
R	Radical
SOD	Superóxido dismutase
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral alfa
TRPA1	Receptor de Potencial Transitório da Anquirina um
TRPV1	Receptor de Potencial Transitório da Vaniloide um
V	Volts
v/v	volume/volume
μg.mL⁻¹	Microgramas por mililitros
μL	Microlitros

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1	UVA: POTENCIAL DO GÊNERO VITIS.....	19
2.2	SUBPRODUTOS DO PROCESSAMENTO DA UVA	21
2.3	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS SUBPRODUTOS DA AGROINDÚSTRIA VINÍCOLA.....	23
2.3.1	Compostos Fenólicos	23
2.3.1.1	Ácidos Fenólicos	25
2.3.1.2	Estilbenos	27
2.3.1.3	Taninos.....	28
2.3.1.4	Flavonoides	31
2.3.1.5	Antocianinas	32
2.4	RADICAIS LIVRES, ESTRESSE OXIDATIVO E POTENCIAL ANTIOXIDANTE	34
2.5	INFLAMAÇÃO E ESPECIES REATIVAS	37
2.6	FUNDAMENTAÇÃO TEORICA DOS MÉTODOS.....	40
2.6.1	Métodos de Determinação da Atividade Antioxidante	40
2.6.2	Determinação de Fenólicos Totais	42
2.6.3	Espectrometria de Massas	43
2.6.4	Carragenina.....	48
3	OBJETIVOS	48
3.1	OBJETIVOS ESPECIFICO.....	48
4	MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1	MATERIAL VEGETAL	49
4.2	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS.....	49
4.3	TESTE PRELIMINAR	51
4.3.1	Atividade Antioxidante	51
4.3.1.1	Determinação da Atividade Antioxidante pelo Método de Seqüestro de Radicais Livres (DPPH).....	51
4.3.1.2	Capacidade Sequestradora do Radical 2,2', azinnobis (3- etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS+)	51
4.3.1.3	Análise estatística da atividade antioxidante	52
4.3.2	Compostos Fenólicos Totais	52

4.3.3	Flavonoides Totais	53
4.4	IDENTIFICAÇÃO QUÍMICA.....	53
4.4.1	Instrumental.....	53
4.4.2	Preparo do Extrato para Análise em ESI/MS.....	53
4.4.3	Condições de Múltiplas Reações Monitoras (MRM).....	54
4.5	PROTOCOLO EXPERIMENTAL BIOLÓGICO.....	54
4.5.1	Animais.....	54
4.5.2	Administração do Extrato Bruto da Casca da Uva (Vitis Labrusca).....	55
4.5.3	Avaliação da Hiperalgisia Mecânica.....	55
4.5.4	Avaliação da Hiperalgisia Térmica	55
4.5.5	Avaliação do Edema.....	56
4.5.6	Medida da Atividade da Enzima Mieloperoxidase (MPO).....	56
4.5.7	Análise Estatística	57
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	58
5.1	Teste Preliminar	58
5.2	Identificação Química	63
5.3	Potencial Anti-Inflamatório e Analgésico In Vivo	65
6	CONCLUSÃO	70
	REFERÊNCIAS.....	72
	APÊNDICES.....	88
	APÊNDICE 1	89
	APÊNDICE 2	90
	APÊNDICE 3	91
	APÊNDICE 4	92
	APÊNDICE 5	93
	APÊNDICE 6	94
	APÊNDICE 7	95
	APÊNDICE 8	96
	APÊNDICE 9	97

1 INTRODUÇÃO

O Brasil, por ser um país de grande atividade agrícola, é também um dos maiores produtores de resíduos agroindustriais, e com isso a busca por alternativas para utilização dessa matéria orgânica gerada, vem crescendo dentro de vários centros de pesquisa (CATANEO et al., 2008). Nesta perspectiva os produtores e as indústrias da área vinícola enfrentam o problema do descarte da biomassa residual que embora seja biodegradável, necessita de um tempo mínimo para ser mineralizada, constituindo-se numa fonte de poluentes ambientais (CORRÊA, 2011).

O bagaço da uva representa um importante subproduto da indústria vinícola, composto basicamente, por sementes, engaço e casca, tendo uma ampla variedade de biocompostos, na maioria compostos fenólicos como constituintes químicos. Por esse motivo, o conhecimento empírico tem estimulado o uso do extrato obtido do resíduo da uva, tornando-se popular por apresentar diversas atividades biológicas tais como atividade antioxidante, antimicrobiana, capacidade de inibir a nitrosação e capacidade de modular a atividade de algumas enzimas (BACGHI et al., 2000; SHRIKHANDE, 2000; HO; RAFI & GHAI, 2010; XU et al. 2010).

A biomassa residual das indústrias vinícolas apresenta alto teor de compostos bioativos, que são decorrentes das manutenções dos metabólitos primário e secundário presentes na uva, entre suas funções bioativas, podem relacionar aos extratos principalmente a ação anti-inflamatória. Os anti-inflamatórios sintéticos, principalmente os não esteroidais (AINEs), destaca-se entre as classes de medicamentos utilizadas em tratamentos de diversas doenças. Como todo medicamento, os anti-inflamatórios, apresentam efeitos colaterais, tais como: gastrite, úlceras, problemas na coagulação sanguínea e renais, hipertensão e insuficiência cardíaca (BATLOUNI, 2010). Nesse sentido, na constante busca por tratamentos menos evasivos, os produtos naturais representam uma fonte de matéria-prima essencial a novas descobertas de biomoléculas com estímulos anti-inflamatórios, considerados como compostos promissores (HARVEY, 2000; SHUKLA et al., 2010).

Uma opção de tratamentos alternativos é a utilização da biomassa residual, visto que o emprego destes minimiza os impactos causados, reduz o acúmulo dos resíduos gerados (DE OLIVEIRA, 2010; MARTIN, 2011), além de ser um subproduto de alto potencial farmacológico e economicamente viável, o qual,

futuramente, possa substituir os anti-inflamatórios sintéticos com o mesmo potencial farmacológico e menores efeitos colaterais.

Considerando as propriedades farmacológicas dos compostos fenólicos e outros compostos bioativos (KVIECINSKI, 2007; SILVA et al., 2011) encontrados nos resíduos agroindustriais das vinícolas, a presente dissertação teve como objetivo investigar de forma seletiva os principais compostos químicos do extrato hidroetanólico (1:1, v/v) do resíduo agroindustrial da uva (*Vitis labrusca*) e avaliar a sua capacidade sequestradora de radical livre *in vitro*, além do seu efeito analgésico e anti-inflamatório em camundongos induzido por carragenina.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 UVA: POTENCIAL DO GÊNERO *VITIS*

A videira pertencente ao gênero *Vitis*, da família Vitaceae, com aproximadamente 108 espécies, incluem todas as variedades europeias, americanas e asiáticas, sejam elas destinadas à fabricação de sucos, vinhos, vinagres ou consumo *in natura* (CATALUÑA, 1988; SOUZA; MARTINS, 2002; ULIANA, 2013).

A espécie *Vitis vinífera*, variedades cultivadas na região do Cáucaso, compreendida entre a Europa Ocidental e a Ásia Oriental, contribuiu para difundir a espécie devido às suas capacidades de adaptação e características nos vinhos produzidos (CAMARGO et al., 2009). Outra espécie bastante difundida é a *Vitis labrusca*, originária da América do Norte, conhecida como uva americana e utilizadas para consumo *in natura* e processamento de sucos de uva (MATHIAS, 2010; CAMARGO, 2015).

No cenário vitivinicultor brasileiro as uvas americanas, conhecidas como uvas comuns, da espécie *Vitis labrusca* (principais variedades tintas: Isabel, Bordô e Concord) e *Vitis bourquina* (importantes variedades tintas: Couderc Tinto e Seyve Villard Tinto) representam mais de 80% da produção de uvas para processamento e significativa importância como uvas de mesas (CAMARGO, 2015). Entretanto, a partir de meados do século XX o Brasil passou a produzir vinhos finos, com uvas da espécie *Vitis vinífera*, também conhecido como uvas finas. Cerca de 70 variedades compõem o elenco varietal brasileiro de uvas finas para processamento, sendo as principais cultivares tintas Cabernet Sauvignon, Merlot, Cabernet Franc, Tannat, Ancellota, PinotNoir e Egidola (CAMARGO et al., 2009; CAMARGO, 2015).

Em 2015 o Brasil produziu 1.499.353 toneladas de uva em uma área cultivada de 79.094 hectares, sendo que a quantidade de uvas destinadas ao processamento, elaboração de vinhos e bem como seus derivados foi de 781.412 toneladas, fazendo com que o setor de exportação gerasse 81,8 milhões de dólares ao país, segundo levantamentos realizados pelo IBGE. Os estados do Rio Grande do Sul, Pernambuco e São Paulo foram os maiores produtores de uvas e derivados, responsável por 82,5% da produção nacional (IBGE, 2015).

Dentre as variedades de uvas produzidas destacam-se, a espécie Bordô e Isabel, conforme ilustra a Figura 1, como as mais utilizadas na produção de

vinhos tintos e sucos no Brasil (RIZZON, MIELE e MENEGUZZO, 2000; ARAÚJO, 2013).

Figura 1- a) Uva Isabel e b) Uva Bordô



Fonte: a) Souza (2015) b) Canivezi (2015)

Em peculiaridade no regionalismo brasileiro a cultivar Bordô (*Vitis labrusca* L.) tem variação quanto ao nome popular, por exemplo, é conhecido como, 'Bordô' no Rio Grande do Sul e Santa Catarina; 'Terci' no Paraná e 'Folha de Figo' em certas regiões de Minas Gerais. Outra variação está ligada a intempérie entre trópicos que influencia diretamente a produção da cultivar no Brasil, conseqüentemente refletindo no setor comercial, portanto em regiões com inverno definido a produção é mais acentuada, porém nas regiões próximas a linha do Equador acarreta perdas de desenvolvimento e produção. Assim, seu cultivo está restrito aos polos produtores do Sul de Minas Gerais e Norte do Paraná, além dos Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina (BADALOTTI, 2011). Outra característica do cultivar é ser resistente a doenças fúngicas e com excelente fertilidade. Em suma a espécie apresenta alta concentração de matéria corante, o qual origina sucos de cor intensa, melhorando a coloração dos produtos à base de 'Isabel' e de 'Concord', essas peculiaridades e resistências contribuem para alta difusão da espécie no Brasil (RIZZON, MIELE e MENEGUZZO, 2000).

A variedade 'Isabel', é a mais plantada no estado do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Apresenta ótimo desempenho nos climas tropicais do Brasil, com resultados positivos no Noroeste de São Paulo, no Triângulo Mineiro, em Goiás

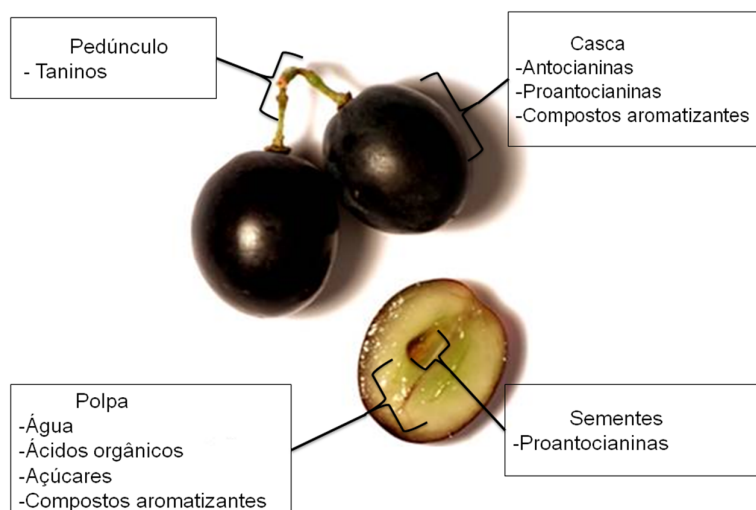
e no Mato Grosso (ARAÚJO, 2013). Proporciona colheitas abundantes com poucas intervenções de manejo. A espécie cultivada na região tem o sabor característico das *labruscas*, adaptando-se a todos os usos: consumo *in natura*; elaboração de vinhos brancos, rosado e tinto, os quais, muitas vezes, são utilizados para a destilação ou para a elaboração de vinagre; origina suco de boa qualidade, e pode ser matéria-prima para a fabricação de doces e geléias (MAIA e CAMARGO, 2005).

2.2 SUBPRODUTOS DO PROCESSAMENTO DA UVA

As vinícolas se destacam entre as indústrias que mais produzem resíduos agroindustriais, cerca de 30% do volume total de uvas utilizadas na produção industrial são rejeitos ou biomassa, o que torna esse setor uma fonte promissora de substâncias quimioativas, isso deve as classes de substâncias presente na uva (MARKIS et al., 2007; RUBILAR et al., 2007; MELO et al., 2011).

Assim a característica desse subproduto do processamento da uva é a riqueza de compostos com propriedades bioativas, dentre eles estão os flavonoides (antocianidinas, flavonóis e flavanóis), os estilbenos (resveratrol), os ácidos fenólicos (derivados dos ácidos hidroxicinâmicos e hidroxibenzóicos) e taninos (ROCKENBACH et al., 2008; OLIVEIRA, 2010). A identificação dos principais compostos distribuídos por parte e conseqüentemente presentes na baga da uva tem sido bastante investigada, conforme ilustra a Figura 2.

Figura 2-Distribuição dos compostos biativos presente na baga da uva



Fonte: Kennedy (2008).

As sementes e cascas de uvas são onde a maior parte dos compostos fenólicos se acumula, porém a concentração depende da variedade e é influenciada por fatores ambientais e de cultivo (KATALINIC et al., 2010; SOUZA, 2013). A obtenção de extrato proveniente do bagaço da uva torna-se frequentemente mais popular para a aquisição de ingredientes funcionais, tais como compostos antioxidantes naturais e suplementos alimentares. Porém, as indústrias químicas, farmacêuticas e alimentícias, vêm modificando sua visão de interesse nas biomassas, buscando explorar e agregar valores aos subprodutos da vinificação (NATIVIDADE, 2010; PATINO, 2017).

Contudo, na busca de novos fármacos provenientes de fontes naturais, não restringindo aos produtos de consumo *in natura*, e levando em conta os resíduos industriais, o emprego da biomassa em processos farmacêuticos pode representar uma alternativa na destinação sustentável para os resíduos. No entanto, é necessário que ocorra a manutenção durante a produção e efetiva recuperação desses compostos bioativos, podendo assim representar significativamente um avanço na sustentabilidade agroindustrial, visto que, para as vinícolas, as quantidades geradas desses resíduos apresentam sérios problemas de armazenagem, de transformação, ou de eliminação, do ponto de vista socioambiental (ROCKENBACH et al., 2008; ROCKENBACH, 2012).

2.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS SUBPRODUTOS DA AGROINDÚSTRIA VINÍCOLA

2.3.1 Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos são uma classe específica de fitoquímicos amplamente encontradas no reino vegetal, composta de aproximadamente 8.000 substâncias já descritas (FARAH e DONANGELO, 2006; OLDONI, 2010). As principais fontes de compostos fenólicos são frutas cítricas, como limão, laranja e tangerina, além de outras, como cereja, uva, pera, maçã e mamão. Outras excelentes fontes fenólicas alimentares é a pimenta verde, brócolis, repolho roxo, cebola, alho e tomate (DEGASPARI; WASZCZYNSKY, 2004; ANGELO; JORGE, 2007; JANIQUES et al., 2013).

Estes compostos são produzidos naturalmente pela planta como metabólitos secundários, tendo como função proteção a agressão de agentes, tais

como bactérias e insetos e atua na regulação da maturação dos frutos (SAMPAIO, 2015). Em certos alimentos, esses compostos exercem uma ação preponderante no desenvolvimento de características sensoriais como a cor, adstringência, aroma e estabilidade oxidativa (MOURE et al., 2001).

No âmbito biológico, estes compostos desempenham importantes atividades como, antialérgica, anti-inflamatória, antimicrobiana, antitrombótica, cardioprotetora, efeitos vasodilatadores e antioxidantes (BENAVENTE-GARCIA et al., 1997; MIDDLETON, KANDASWANI e THEOHARIDES, 2000; MANACH, MAUR e SCALBERT, 2005; OLDONI, 2010). A Tabela 1 apresenta alguns estudos do gênero *Vitis* relacionados ao seu potencial de atividade farmacológica. As atividades biológicas estão relacionadas, principalmente, ao combate à geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), em que contribui de forma significativa para a redução do estresse oxidativo, comum em doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e câncer, por exemplo (SANTOS et al., 2011; CONTRERAS-CALDERÓN et al., 2011; JANIQUES et al., 2013).

Tabela 1-Potencial de atividade farmacológica do gênero *Vitis*

Matriz de estudo	Tipo de estudo	Resultados	Referência
Extrato de uvas e vinho da <i>Vitis vinifera</i> (variedade Merlot)	- Propriedade antitumoral para câncer de mama	Tumores em desenvolvimento a partir de células implantadas podem ser inibidos por polifenóis fornecidos por meio da dieta com vinho e uva	(HAKIMUDDIN et al., 2008)
Cascas e sementes do resíduo agroindustrial <i>Vitis labrusca</i> (variedade Bordô)	- Atividade antioxidante - Atividade antimicrobiana - Atividade <i>Leishmanicida</i>	-Altos valores de atividade antioxidante -Atividade antimicrobiana contra <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Listeria monocytogenes</i> -Capacidade de inibir entre 54,60 a 83,43% a enzima arginase de <i>Leishmania</i>	(SOUZA, 2013)
Sementes de uvas (<i>Vitis vinifera</i>) maduras	- Metabolismo lipídico - Função hepática e renal induzido por paracetamol em camundongos	-Diminuição nos níveis de colesterol sérico, triglicerídeos, LDL, VLDL e aumento no nível de HDL -Hepatoproteção com redução das enzimas hepáticas -Aumento nos níveis de GSH, SOD e CAT para os parâmetros renais e peroxidação lipídica	(ALMAJWAL e ELSADEK, 2015)
Folhas da <i>Vitis vinifera</i>	- Atividade anti-inflamatória - Atividade analgésica - Atividades antipiréticas (dosagem de 100, 200 e 400 mg/kg)	- Inibição contra edema de pata induzido por carragenina entre 34,48% a 41,37 no estudo de atividade anti-inflamatória -Redução entre 48,15% a 68,09% da permeabilidade vascular induzida por CH ₃ COOH para atividades antipiréticas. - Percentagem de inibição de 50% sugere que a atividade analgésica não possui ação no sistema central.	(AOUEY et al., 2016)

Quimicamente, os compostos fenólicos são definidos como substâncias que possuem em sua estrutura um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos (MALACRIDA, DA MOTTA, 2005). Esses fitoquímicos são subdivididos em quatro grupos: ácidos fenólicos, estilbenos, taninos e flavonoides, classificados quanto aos diferentes grupos em função do número de anéis de fenol que contêm e dos elementos estruturais que ligam estes anéis, cada um descrito a seguir (SOARES et al., 2008; JANQUES, 2013).

Atualmente, uma fonte interessante de compostos fenólicos são os subprodutos do suco de uva e da produção de vinho, o qual vem despertado interesse devido às suas propriedades antioxidantes e seus efeitos benéficos à saúde (VENDANA et al., 2008; JANQUES, 2013). No processo de vinificação, os compostos fenólicos são extraídos da uva *in natura* ao longo da maceração e transferidos para o mosto. Dependendo desse processo e da variedade da uva muitos desses compostos são encontrados no bagaço (CAMPOS, 2005; OLIVEIRA, 2010). Outros fatores podem influenciar a quantidade disponível de componentes fenólicos no bagaço que são: cultivar, formas de manejo das videiras, tempo de contato entre as cascas e o vinho durante a fermentação, temperatura de processo extrativo e fermentativo, presença de sementes e engaços durante todo o processo, fatores estes que são interferentes na transferência de fenólicos para o mosto (GÓMEZ-MÍQUEZ et al., 2007; OLIVEIRA, 2010).

2.3.1.1 Ácidos Fenólicos

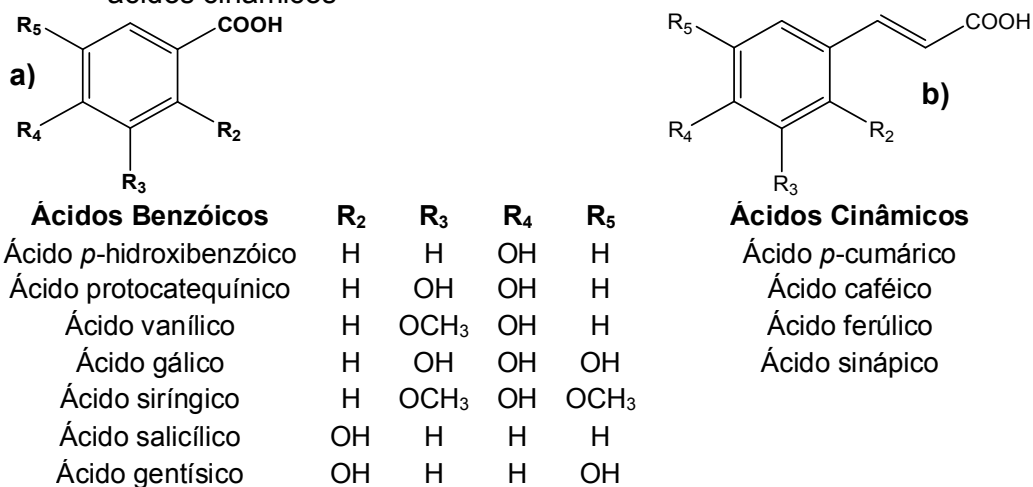
Os ácidos fenólicos são compostos simples formados por anel aromático, com substituintes capazes de sequestrar espécies reativas ligados à sua estrutura, como o radical hidroxila e o oxigênio singleto. Dentre os ácidos fenólicos, existe uma divisão em dois grupos de substâncias: os ácidos benzóicos e ácidos cinâmicos (OLIVEIRA, 2010; SILVA, 2013).

Os ácidos benzóicos possuem sete átomos de carbono na forma C_6-C_1 , conforme ilustra a Figura 3a. A distinção dentre os ácidos benzóicos são suas substituições em seus anéis e podem ser encontrados na forma livre, monoglicosilada ou na forma de ésteres. Os mais simples ácidos fenólicos encontrados na natureza são o ácido gálico, *p*-hidroxibenzóico, protocatecuico,

vanílico e siríngico (OLDONI, 2010; OLIVEIRA, 2010; SILVA, 2013).

Já os ácidos cinâmicos que possuem nove átomos de carbono na forma C₆-C₃, ilustrado na Figura 3b. Além de se apresentarem sob sua forma livre, podem estar ligados entre si ou com outros compostos. Os ácidos cinâmicos são a segunda classe mais abundante dos ácidos fenólicos dentre os quais estão os ácidos caféico, ferúlico, *p*-cumárico e sinápico (ROCKENBACH, 2008; SILVA, 2013).

Figura 3- Estruturas químicas dos ácidos fenólicos: a) ácidos benzóicos e b) ácidos cinâmicos

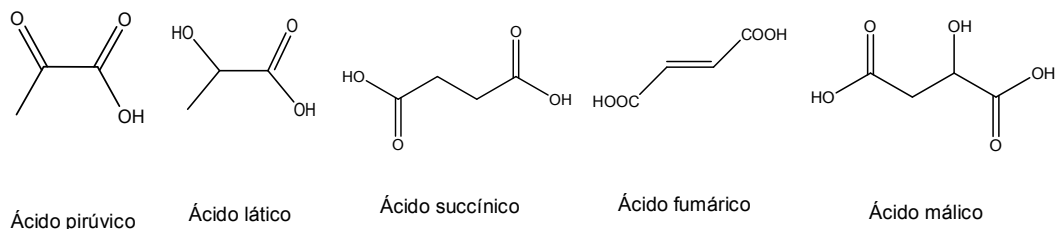


Fonte: Balasundram et al. (2006); Silva (2013)

Além dos ácidos benzóicos, na polpa e casca da uva estão presentes também os ácidos hidroxicinâmicos, responsável pela oxidação do mosto e vinhos (SINGLETON, 1987; BOVOLENTA, 2015). Porém, durante o amadurecimento e fermentação do vinho a concentração desses compostos é reduzida (MACHEIX, SAPISE e FLEURIET, 1991; OLDONI, 2010). Durante a fermentação do mosto, outros ácidos orgânicos de cadeia C₃-C₅ podem ser transferidos para o vinho e, conseqüentemente, aumentar os teores desses ácidos, ao invés dos ácidos fenólicos. Esses ácidos orgânicos consistem em moléculas polifuncionais que contém na maioria das vezes grupos hidroxilas, conferindo-lhe características polares, hidrofílicas e reatividade química, por via podem contribuir para o envelhecimento do vinho ao longo do tempo. Assim os principais ácidos produzidos a partir da fermentação do mosto são: ácido pirúvico, ácido láctico, ácido succínico, ácido fumárico e ácido málico, elencados

na Figura 4 (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006; SILVA, 2013).

Figura 4-Estruturas dos principais ácidos da fermentação



Fonte: Silva (2013)

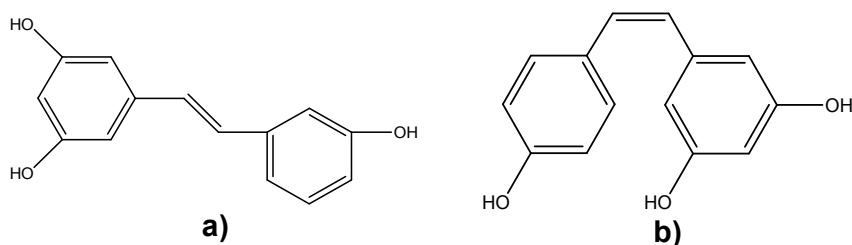
2.3.1.2 Estilbenos

Os estilbenos são fitoalexinas pertencentes aos metabólitos secundários, potentes antimicrobianos, em características com baixa massa molecular e sendo produzidos pelas plantas em resposta a estresses físicos, químicos ou biológicos ocorridos em seu nicho ecológico. Em alguns estudos, os compostos pertencentes a esta classe tem potencial de impedir ou reduzir a atividade de agentes patogênicos (STANGARLIN et al., 2010). Bravo, 2008 elenca atividades ligadas à proteção contra os raios ultravioleta e ação fungitóxica (ação antimicrobiana direta) como elicitora, ativando mecanismos de defesa nas plantas (ação indireta) (BRAVO, 2008, STANGARLIN, 2011). Dentre os estilbenos conhecidos destacam-se o resveratrol (*trans*- 3,5,4'-trihidroxistilbeno), o piceid (*trans*- 3,5,4'-trihidroxistilbeno- 3-O-B-D-glucosídeo) e o astringin (3'-hidróxi-*trans*- 3,5,4'- trihidroxistilbeno-3-O-B-D-glucosídeo) (FLANZY, 2000; COPELLI, 2005).

O resveratrol é um composto popular encontrado na uva, essa substância fenólica é decorrente de compostos denominados fitoalexinas. Naturalmente sua síntese ocorre em diversos vegetais em resposta a condições adversas. Segundo Botti (2016), que caracterizou o resveratrol em bagaço de uva, elencou as videiras como as espécies com maior capacidade de síntese do composto, sendo encontrada em maiores quantidades na película do fruto e principalmente nas uvas tintas. Além da uva (*Vitis vinifera* L.), o amendoim (*Arachis hypogaea*) sintetiza o resveratrol, entretanto existem outras 72 espécies

de plantas que já foram descritas como capazes de sintetizar o resveratrol. O resveratrol é um composto originário de uma família de moléculas que incluem os glicosídeos e os polímeros e existe nas configurações *cis*- e *trans*- (Figura 5). Em vinhos a forma predominante do resveratrol é a *trans*-, sendo provavelmente formado durante o processo de vinificação (FLANZY, 2000).

Figura 5-Fórmula estrutural do *trans* (a) e *cis*-resveratrol (b).



Fonte: Jeandet et al. (1995)

O resveratrol possui efeitos biológicos importantes, como melhorar a tolerância à glicose em diabéticos, atenuar os sintomas da menopausa e proteger contra a osteoporose, câncer e mal de Alzheimer (DAVID et al., 2007; BAXTER; 2008; OLIVEIRA, 2010). Em comum esses estudos relatam propriedades antioxidantes correlacionadas à prevenção de doenças cardiovasculares (GOLDBERG et al., 1996), anticancerígenas e propriedades anti-inflamatórias (REGINA et al., 2002; SAUTTER et al., 2003).

O teor de resveratrol presente nas uvas depende muito da variedade e também do tempo de maturação dos frutos, pois, em frutos muito maduros o teor do composto é praticamente indetectável em métodos químicos-analíticos (JEANDET, BESSIS e GGAUTHERON, 1991). Além disso, a etapa de maceração do bagaço em álcool torna a disponibilidade do resveratrol quase mínima, pois esse processo de vinificação é crucial para produção de vinhos tintos, fazendo com que o resveratrol presente na película da uva seja extraído, assim o composto passa para o mosto reduzindo significativamente o teor no bagaço (COPELLI, 2005; OLIVEIRA, 2010).

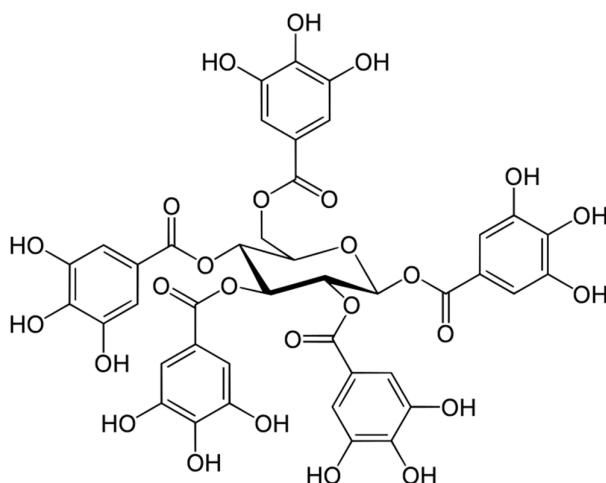
2.3.1.3 Taninos

Os taninos são compostos pertencentes ao metabolismo

secundário, quimicamente essa classe é formada de polifenóis (simples e complexos), que, por não se cristalizarem, são difíceis de serem separados (ROBBERS, 1997, JESUS, 2012). Suas características químicas incluem solubilidade em água e peso molecular entre 500 e 3000 Dalton, possuindo a habilidade de formar complexos insolúveis em água com proteínas, gelatinas e alcaloides, além de algumas atividades farmacológicas, fatores de controle de bactérias, fungos e insetos (MELLO e SANTOS; 2001). As atividades farmacológicas dos taninos são devidas a três ações comuns aos dois grupos de taninos (JESUS, 2012). Essas ações correspondem: a habilidade de complexação com moléculas e logo com macromoléculas (ou seja proteínas e polissacarídeos); apresentam também atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres; outros estudos demonstraram o importante fator de complexação com íons metálicos, como ferro, manganês, cobre, alumínio, cálcio, entre outros (JESUS, 2012, SANTOS et al., 2004). De acordo com Santos et al. (2004), quando envolvidos em processos de cura de feridas, queimaduras e inflamações, os taninos ajudam na recuperação, formando uma película protetora sobre a mucosa ou a pele, assim contribuindo na recuperação natural do organismo. Tais compostos influenciam nas características organolépticas, sendo responsável pela adstringência de muitos alimentos e bebidas, especialmente chá, café e vinhos (DEWICK, 2002). A quimioclassificação dos taninos se baseia na identidade dos núcleos fenólicos e na maneira como se unem, sendo divididos em duas classes: a classe dos taninos hidrolisáveis e a classe dos taninos condensados (SIMÕES, 2010 e JESUS, 2012)

Os taninos hidrolisáveis consistem em ésteres derivados de ácidos gálicos (galotaninos) e ácidos elágicos (elagitaninos) glicosilados, formado a partir da via do chiquimato, onde os grupos hidroxila do açúcar são esterificados com os ácidos fenólicos. Em taninos hidrolisáveis o composto β -1,2,3,4,6-pentagalossil-D-glicose, Figura 6, representa o máximo grau de substituição na β -D-glicose, sendo considerado o precursor imediato para as galotaninos e elagitaninos (SIMÕES, 2010).

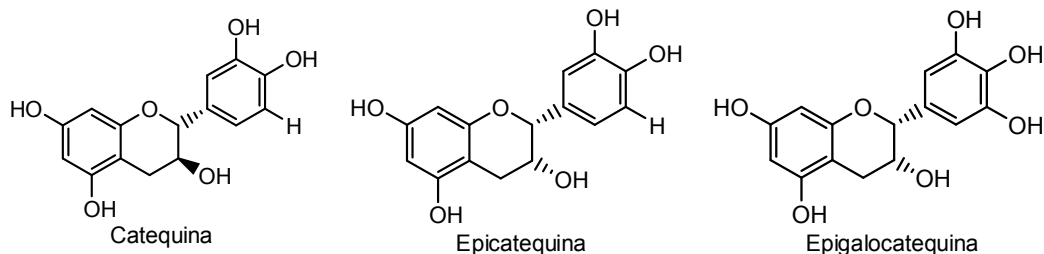
Figura 6- Estrutura do composto β -1,2,3,4,6-pentagaloi-D-glicose, para taninos hidrolisáveis.



Fonte: Simões (2010).

Os taninos condensados ou proantocianidinas, largamente encontrados no reino vegetal, são polímeros e oligômeros de flavan-3-ol e/ou flavan-3,4-diol, produtos do metabolismo do fenilpropanol. As proantocianidinas, assim denominadas atualmente, apresentam ampla diversidade estrutural, sendo composta de moléculas monoméricas de catequina, epicatequina e epigalocatequina, os quais são flavonoides comuns como monômeros livres (FIGURA 7) (MAZZA, 1995; MONTEIRO et al., 2005; OLDONI, 2010).

Figura 7-Estruturas principais dos taninos condensados



Fonte: Cabrita, Ricardo-da-Silva e Laureano (2004)

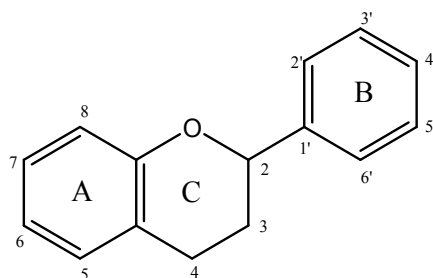
Dentre esses dois grupos de taninos, somente os taninos condensados ocorrem nas uvas e seus derivados. Os monômeros, oligômeros e polímeros formados a partir de catequina e epicatequina são encontrados em uvas da espécie *Vitis vinifera* (OLDONI, 2010). Conforme Jordão et al. (2000), ao estudar parte do cacho de uva (semente, casca ou engaço) espécies

diferentes de uva, diferentes práticas de manejo na cultura da vinha durante a maturação, fatores de adubação, manutenção folhear da vinha e a prática da desfolha, demonstrou que direta e indiretamente podem influenciar os teores de taninos na uva.

2.3.1.4 Flavonoides

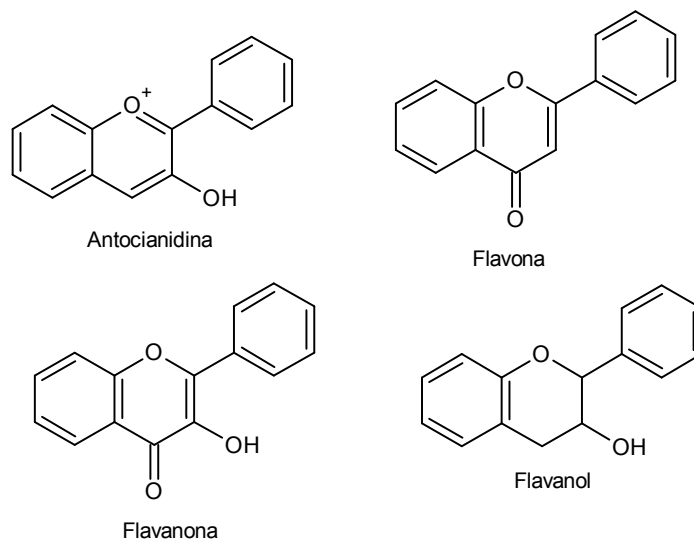
Dentre os compostos fenólicos, os flavonoides constituem-se como maior grupo de compostos presentes em plantas. A estrutura dos flavonoides é composta por dois anéis aromáticos, A e B, ligados por um anel pirano C6-C3-C6, conforme ilustra a Figura 8. As subclasses dos flavonoides provêm das variações de substituição do anel C, apresentada na Figura 9, originando assim flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavonóis (catequina) e antocianinas (ROCKENBACH, 2008; OLIVEIRA, 2010; BOVOLENTA, 2015).

Figura 8-Estrutura genérica dos flavonoides



Fonte: Balasundram et al. (2006)

Figura 9-Estrutura genérica das principais classes de flavonoides



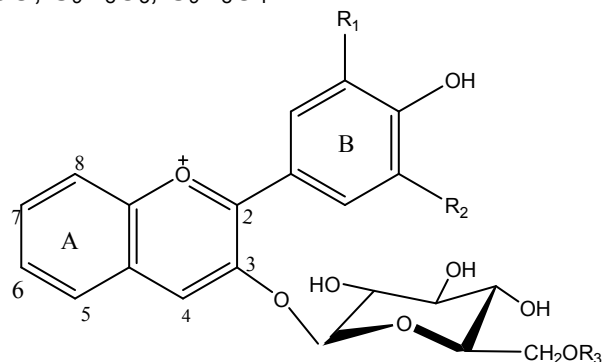
Fonte: Balasundram et al. (2006)

Em suma os flavanoides são responsáveis pela coloração das flores e frutos. Nos tecidos da uva (semente, casca e polpa) são encontrados esses compostos, o qual origina coloração em vinhos. Entre as características dos flavonoides é a sua capacidade de ser polimerizados com açúcares, não flavonoides e até mesmo com outros flavonoides. Comumente em vinhos a maior parte são catequina, proantocianidinas e antocianinas (CABRITA, RICARDO-DA-SILVA e LAUREANO, 2004).

2.3.1.5 Antocianinas

A subclasse antocianinas, pertencente aos metabólitos secundários originados a partir da classe dos flavonoides, são heterosídeos que normalmente apresentam em sua estrutura química um resíduo de açúcar no carbono 3, dentre eles glicose, xilose, arabinose, ramnose, aos quais podem estar ligados a ácidos fenólicos, como p-cumárico, fenílico e vanílico, como ilustra a Figura 10. A reação de hidrólise desses heterosídeo origina uma molécula glicídica e uma aglicona, sendo a última denominada antocianidina (DEWICK, 2002; ANDERSEN e JORDHEIM, 2006; PEREIRA e CARDOSO, 2012).

Figura 10- Estrutura química da antocianina 3-glicosídeo. A posição $R_3 = H$; CH_3CO ; $C_9H_8O_3$; $C_9H_8O_4$



As antocianidinas mais comuns são as delphinidina, cianidina, petunidina, pelargonidina, peonidina e malvidina, o qual representa a aglicona na maioria das plantas, conforme ilustra a Figura 10 e Tabela 2. Elas diferem devido ao número de grupos hidroxilas e/ou metoxi presentes, tipos, números, sítios de ligação dos açúcares na molécula e tipos e número de ácidos alifáticos ou aromáticos que estão ligados aos açúcares da molécula (SCHWARTZ et al., 2010; SOUZA, 2013).

Tabela 2- Principais substituintes das antocianinas

Antocianina	R1	R2
Pelargonidina (pg)	H	H
Cianidina (cy)	OH	H
Peonidina (pn)	OCH ₃	H
Delphinidina (dp)	OH	OH
Petunidina (pt)	OCH ₃	OH
Malvidina (mv)	OCH ₃	OCH ₃

Fonte: Terzi e Rossi (2002)

As antocianinas são um grupo de pigmentos naturais com estruturas fenólicas variadas. A presença da molécula de açúcar nas antocianinas confere maior solubilidade e estabilidade aos pigmentos, no entanto, pode promover menor atividade antioxidante quando comparado com as antocianidinas. Esses pigmentos naturais são componentes de muitas frutas vermelhas e hortaliças escuras, apresentando grande concentração nas cascas de uvas tintas e está amplamente empregada na dieta diária (ARAÚJO, 2008; WU et al, 2013).

Para a elaboração de vinhos tintos, as antocianinas é um componente importante para a produção, devido a sua contribuição para os atributos sensoriais e, principalmente, para a coloração do produto (MUÑOZ-ESPADA et al., 2004). Uma fonte alternativa de antocianinas são os resíduos das indústrias vinícolas, extraídas com uma combinação de solventes orgânicos (água, etanol, metanol, por exemplo) e ácidos (ácido acético, ácido clorídrico, ácido fórmico), porém o processamento da uva faz com que as antocianinas sejam hidrolisáveis perdendo a parte glicosídica, originando as antocianidinas (MONRAD et al., 2010; SOUZA, 2013).

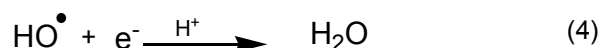
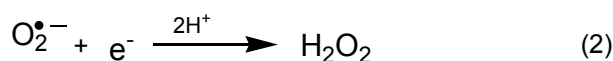
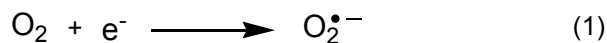
Em relação aos estudos de caracterização, biomonitoramento e utilização generalizada das antocianinas o grande entrave para essa utilização é a baixa estabilidade (FERREIRA, 2013). Segundo Francis (1989), os fatores que influenciam principalmente a estabilidade dessas moléculas são a estrutura química (carga formal de +1 na carbonila do C2), pH, temperatura, luz, presença de oxigênio, degradação enzimática e interações entre os compostos dos alimentos, tais como ácido ascórbico, íons metálicos, açúcares e copigmentos. A maior estabilidade das antocianinas se dá em pH ácido, baixas temperaturas, baixa concentração de oxigênio, ausência de luz e baixa atividade de água (SCHWARTZ et al, 2010).

2.4 RADICAIS LIVRES, ESTRESSE OXIDATIVO E POTENCIAL ANTIOXIDANTE

O oxigênio molecular é parte essencial na vida aeróbica, sendo responsável pelo complexo processo de fosforilação oxidativa, ou seja, é o último aceptor de elétrons na respiração mitocondrial, em que esse oxigênio molecular sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação da água, conforme descrito abaixo (Reação 1 - 4) (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; KVIECINSKI, 2007). Durante esse processo são formados intermediários reativos denominados radicais livres, cujos elétrons desemparelhados encontram-se centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio, ERO ou ERN, respectivamente. As principais EROs distribuem-se em dois grupos, os radicalares: hidroxila (HO^{\bullet}), superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peroxila (ROO^{\bullet}) e alcóxila (RO^{\bullet}); e os não-radicalares: oxigênio, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso. Dentre as ERN incluem-se o óxido nítrico ($^{\bullet}\text{NO}$), óxido nitroso

(N₂O₃), ácido nitroso (HNO₂), nitritos (NO₂⁻), nitratos (NO₃⁻) e peroxinitritos (ONOO⁻) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; BARREIROS, 2006).

Reação 1-4: Redução tetravalente do oxigênio molecular a água



O excesso desses radicais é combatido por substâncias antioxidantes produzidas pelo organismo ou ingerido na dieta. Os antioxidantes são quaisquer substâncias que, quando presente em baixa concentração e quando comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo (HALLIWELL, 2000). Essas defesas antioxidantes produzidas pelo corpo podem agir enzimaticamente, a exemplo as enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) ou, já as não enzimaticamente: a glutathiona reduzida (GSH), ascorbato (ASC), peptídeos de histidina e proteínas ligadas ao ferro (transferrina e ferritina). Já os antioxidantes provenientes da dieta, no qual o organismo utiliza de forma intermediária são: o α -tocoferol (vitamina-E), β -caroteno (provitamina-A), ácido ascórbico (vitamina C), e compostos fenólicos onde se destacam os flavonoides (quercentina) e taninos (ácido elágico) (HUSAIN e CILLARD, 1987; HALLIWELL et al., 1992; HALLIWELL et al., 1995; PIETA, 2000). Entretanto, o organismo pode estar submetido a um processo denominado de estresse oxidativo, devido a produção excessiva de EROs e/ou uma diminuição das defesas antioxidantes capaz de comprometer o balanço redox. Quando ocorre um desequilíbrio na relação ERO e defesas antioxidantes, duas situações são esperadas. A primeira ocorre quando as defesas antioxidantes naturais e as moléculas antioxidantes ingeridas pela dieta encontram-se em maiores números do que as espécies reativas produzidas pelo organismo. Nesse caso, acontece uma redução nos níveis normais de espécies reativas, resultando em uma incapacidade de sinalização

celular, ocasionando em perda da capacidade proliferativa da célula. A outra probabilidade, as defesas e moléculas antioxidantes são insuficientes para neutralizar o excesso de espécies reativas formadas, ocasionando lesões em organelas, membranas, tecidos, enzimas, causando em perda de função celular e/ou tecidual, desenvolvendo uma patologia específica (HENSLEY et al., 1995; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

As EROs podem reagir com biomoléculas tais como proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos e carboidratos, seja através de ligações covalentes ou por ataque às cadeias laterais (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; KVIECINKSI, 2007). Assim, quando os níveis dessas espécies estão elevados no organismo ocorre o processo degenerativos e de envelhecimento, conseqüentemente, essa ação pode acarretar o desenvolvimento do câncer, aterosclerose, doenças neurodegenerativas e cataratas (FERREIRA, 1997; HARMAN, 1992; KVIECINKSI, 2007). Já as ERNs, podem estar relacionadas às doenças inflamatórias, por exemplo, artrite crônica, enfisema de pulmão e aterosclerose (SIES, 1993; KVIECINKSI, 2007).

Produtos naturais com atividades antioxidantes são importantes para atenuar o dano oxidativo e assim se tornam imprescindíveis seu uso, estudo e conhecimento químico para complementar as defesas dos organismos frente às espécies reativas. O interesse pelos efeitos antioxidantes dos produtos naturais vem crescendo atualmente, com foco na saúde e na doença. Assim os polifenólicos e em particular os flavonoides, presentes na maioria das plantas, foram sugeridos como efetores no papel de manutenção da saúde humana e na prevenção de diversas doenças, pois possuem estrutura ideal para sequestro de radicais (MONTORO et al., 2004; BARREIROS, 2006).

De acordo com a literatura as atividades antioxidantes caracterizadas empregando as uvas têm sido associadas às composições fenólicas tais como as antocianinas, flavonóis, flavanóis, proantocianidinas e ácidos fenólicos (ARCHELA et al., 2013). Outro exemplo é o ácido elágico, encontrado principalmente na uva, morango e nozes, também associado na prevenção do desenvolvimento do câncer induzido pelas substâncias provenientes do uso do cigarro (BARREIROS e DAVID, 2006).

Atualmente, existem diversos estudos frente à capacidade antioxidante de resíduos do processamento de uva. Rockenbach e

colaboradores (2008) quantificaram os compostos fenólicos totais, antocianinas totais e atividade antioxidante no extrato de bagaço de uva *Vitis vinifera* das variedades Tannat e Ancelota, concluíram que o solvente utilizado na extração do bagaço da uva afeta diretamente os conteúdos fenólicos, antioxidantes e antocianidínicos. Já Melo (2010), analisou quinze resíduos agroindustriais, dentre os resíduos inclui-se o bagaço da uva sendo verificado o teor fenólico, potencial antioxidante, atividade antimicrobiana e composição química por CG/MS com extratos de diferentes polaridades e concluiu que os bagaços estudados de origem vinícola, apresentam maior quantidade de compostos bioativos e potencial fenólico.

2.5 INFLAMAÇÃO E ESPECIES REATIVAS

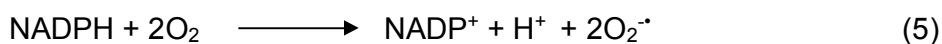
A inflamação é uma patologia associada a diversos fatores, dentre estes danos causados pelas espécies reativas, ocorre por meios de estímulos como exposição a agentes quimiotáticos como a citocinas, IL-8, e produtos da via da lipo-oxigenase, leucotrieno B₄, já nos imunocomplexos, as proteínas bacterianas e nucleoproteínas, e ação de macrófagos produzidos pelos neutrófilos. Assim, o principal radical livre envolvido no processo de inflamação é o óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$), produzido por células endoteliais, macrófagos e neurônios específicos. É um gás solúvel, possui ação parácrina, isto é, age em células próximas ao local de sua produção, possui meia vida curta e o principal produtor desse radical livre é a enzima NO-sintase, presente em células endoteliais e em macrófagos. Quando um estímulo inflamatório é provocado, produção e liberação da enzima pela célula ocorre, conseqüentemente aumenta a liberação de $\cdot\text{NO}$ e ações como relaxamento do endotélio (vasodilatação), destruição de microrganismos e reação com o superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) são obtidas (DUSSE et al., 2003; WIESE, 2008).

O processo de explosão oxidativa ocorre quando a célula “ativada”, neutrófilo da corrente sanguínea em curso de reação inflamatória, começa a consumir ativamente oxigênio em suas mitocôndrias, no qual esse consumo não é direcionado para o seu próprio metabolismo celular e, sim, para a produção de espécies reativas de oxigênio (SGARBI et al., 2006). Como defesa enzimática, os neutrófilos sofrem um processo de desgranulação com a

liberação para o citoplasma da enzima mieloperoxidase (MPO). Portanto, MPO é uma heme proteína que compõe o sistema H₂O₂-MPO-Hialida, um eficiente e importante sistema com ação antimicrobiana presente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos. O sistema H₂O₂-MPO-Hialida sintetiza o H₂O₂ pelos neutrófilos por ação da SOD, a partir de 2 moléculas de O₂^{•-} (WINTERBOUM et al., 1992; WIESE, 2008). Um importante papel da MPO, na presença de cloreto, conversão em H₂O₂ em ânion hipoclorito (OCl⁻), no qual é uma citotoxina responsável pela defesa do organismo contra invasores (bactérias, vírus) e células tumorais, mas por outro lado em excesso pode causar dano aos tecidos normais (BABIOR, 1999; BOGDAN, 2001). A enzima MPO gera outros agentes oxidantes, incluindo o radical hidroxila ([•]OH) e o oxigênio singlete (¹O₂) (STEINBECK et al., 1992; WIESE, 2008).

Outro papel importante dentro do contexto reativo é a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) oxidase, que é uma enzima que catalisa a produção de ânions superóxidos a partir de O₂ e NADPH, conforme a Reação 5, quando presente na membrana plasmática dispara a explosão respiratória e, conseqüentemente, a formação de espécies reativas (LUNARD e LIMA, 2006). O ânion superóxido é produzido nos fagócitos em desenvolvimentos, onde o radical livre atua como agente tóxico para organismos que entram em contato com estes fagócitos (BATOT et al., 1995; WIESE, 2008).

Reação 5 – Produção de ânions superóxidos a partir de NADPH



Existem outros dois mediadores do processo inflamatório que são capazes de induzir a produção de espécies reativas, a interleucina 1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral α (TNF- α).

No perfil inflamatório, as células competentes da resposta imunológica são ativadas e atuam no processo de inativação e/ou destruição dos microrganismos invasores, remoção de substâncias irritantes e antígenos protéicos, além de iniciar a reparação tecidual. Ao fim do processo reparatório, naturalmente os sinais de inflamação desaparecem (KEDAGE et al., 2007).

As plantas são utilizadas de forma ampla, em geral o uso de bioativos é empírico. Assim, utilizando-se de forma popular e generalizada para tratamento de diversos sintomas comum a diversas doenças, entre eles a dor é a principal razão pela procura de tratamento especializado (NATHAN, 2002), no qual existe uma grande demanda por medicamentos cada vez mais eficazes (SHERWOOD et al., 2004). Dentre as classes de medicamentos, atualmente empregados, estão os anti-inflamatórios muito utilizados em diferentes tipos de patologias infecciosas ou não (KEDAGE et al., 2007). Como o uso de medicamentos, não diferente aos anti-inflamatórios, apresentam efeitos colaterais quando utilizados de forma empírica, tais como: gastrite, úlceras, problemas na coagulação sanguínea e renais, hipertensão e insuficiência cardíaca (BATLOUNI, 2010). Nesse sentido, a constante busca por tratamentos alternativos, os produtos naturais que representam uma fonte de matéria-prima essencial a novas descobertas e, sobretudo menos evasivos no sistema imunológico, tem-se desenvolvido na indústria farmacológica e se popularizado, assim sendo, a utilização de moléculas com efeito anti-inflamatório são promissores quando ligado a baixos efeitos colaterais devido ao alto uso desse composto (HARVEY, 2000; SHUKLA et al., 2010).

Com essa perspectiva os metabólitos secundários da uva vêm sendo o foco de estudo com aplicações biológicas importantes, dentre os estudos se destaca a utilização desses compostos como analgésicos e anti-inflamatórios com o intuito de controlar a dor e inflamação. Chung e colaboradores (2011) verificaram que os compostos fenólicos presentes na uva podem atuar diretamente sobre os fatores de transcrição envolvidos na resposta inflamatória, assim inibindo a expressão de citocinas. A ingestão de vinho e suco de uva está relacionada com a redução nos níveis de marcadores inflamatórios, como citocinas (IL-4, IL-10, IL-13) e quimiocinas (CCR1, CCR2, CCR5, CXCR3, CXCR4 e CX3CR1) (Séfora-Sousa e Angelis-Pereira, 2013). A uva *in natura* (*Vitis vinifera*) (500 mg/Kg) é capaz de exercer efeito anti-inflamatório intestinal, diminuindo alguns mediadores pró-inflamatórios (COX-2, NF-κB e molécula de adesão intestinal MadCAM-1) e atividade da MPO, além de aumentar a produção da citocina anti-inflamatória IL-10 (Ferreira, 2009). Portanto, a biomassa residual das indústrias vinícolas constitui-se de alto teor de metabólitos secundários (compostos fenólicos), o qual relaciona a ação anti-inflamatória dos extratos.

Avaliar o potencial antioxidante, identificar os compostos bioativos presente em extratos vegetais, no caso da casca uva de biomassa residual, é importante pelo fato de esclarecer a sua ação farmacológica. Isto é, os compostos presente na biomassa, flavonoides e antocianinas por exemplo, apresentam características estruturais de potencial antioxidante e conseqüentemente ação anti-inflamatoria.

2.6 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA DOS MÉTODOS

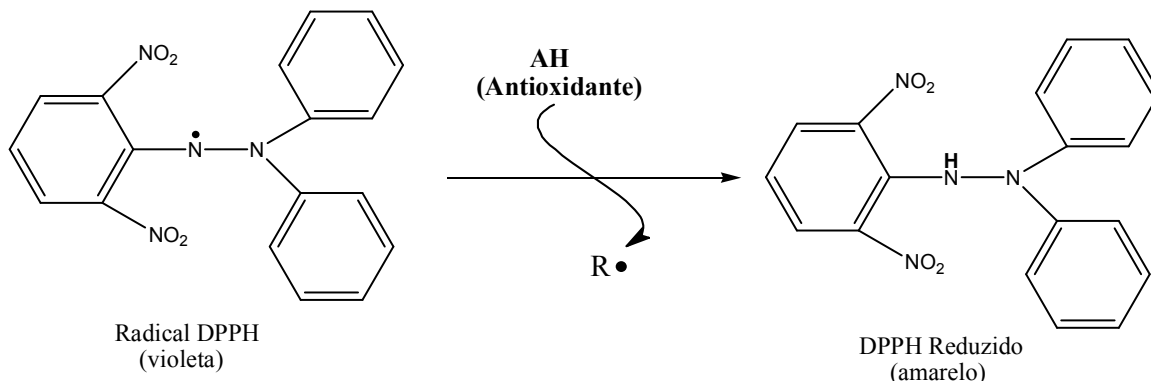
2.6.1 Métodos de Determinação da Atividade Antioxidante

Vários métodos são utilizados para determinar a atividade antioxidante em extratos e substâncias isoladas, no qual influencia interferentes e fundamentos diversos. Com isso, atualmente preconiza-se a utilização de duas ou mais técnicas ocasionando maior precisão na determinação da capacidade antioxidante total da amostra (HUANG, OU e PRIOR, 2005).

Dentre os métodos, o mais utilizado para a determinação da atividade antioxidante é o método de sequestro ou absorção do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil). O DPPH é um radical de nitrogênio orgânico, estável, de coloração violeta e absorção máxima no visível de 515-520 nm. Sua estrutura, Figura 11, pode facilmente aceitar um elétron ou radical hidrogênio para tornar-se estável e raramente pode ser oxidada irreversivelmente (BLOIS, 1958).

Por ação de um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar (R), ocorrerá à redução do DPPH, modificando a coloração para amarelo, com conseqüente desaparecimento da absorção, sendo possível monitorá-la em função da absorbância, conforme mecanismo apresentado na Figura 11. A partir dos resultados encontrados, determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres e/ou a porcentagem de DPPH remanescente no meio reacional, num determinado tempo (BRAND-WILLIAMS et al., 1995; SÁNCHEZ-MORENO, LARRAURI et al., 1998).

Figura 11- Estrutura química do radical DPPH e reação de estabilização com um antioxidante



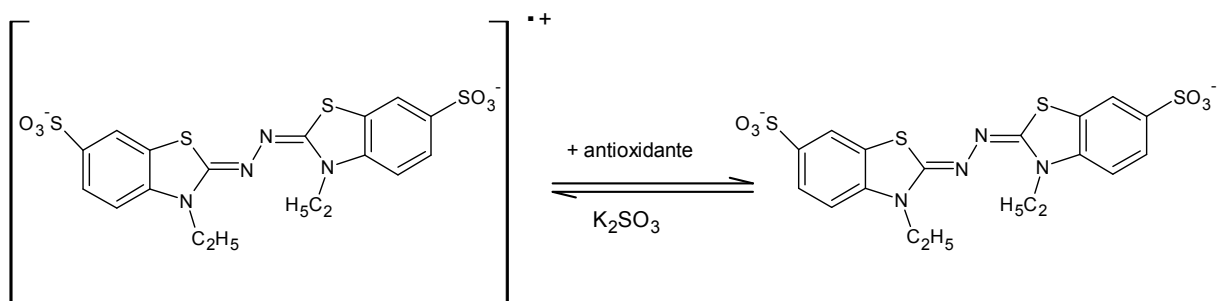
Fonte: Moon e Shibamoto (2009)

A vantagem do método DPPH é a rapidez, simplicidade, precisão e reprodutibilidade, que não envolve condições drásticas de temperatura e oxigenação. As preocupações, quanto à utilização do método e interpretação dos resultados são: o tipo e concentração do composto analisado, cinética de reação do antioxidante, características do meio reacional (pH, tipo de solvente), presença de interferentes, sinergismo, afinidade solvente-substrato e forma de expressão dos resultados, o que pode acarretar respostas equivocadas quanto ao potencial antioxidante (MOLYNEUX, 2004).

O método ABTS (2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolína-6-ácido sulfônico)), necessita que o radical livre seja gerado por reações enzimáticas ou químicas, o que não ocorre no DPPH. Tem sido aplicado para medir a atividade antioxidante de soluções puras, misturas aquosas e bebidas, além de uma ampla utilização na faixa de pH, inclusive para estudar efeitos de sua variação em mecanismos antioxidantes (PRIOR, WU e SCHAICH, 2005).

A formação do radical livre ABTS, de coloração azul-esverdeada, dá-se, pela oxidação do ABTS pelo persulfato de potássio, com absorção máxima nos comprimentos de onda de 734 nm. Com a adição de antioxidantes ao radical pré-formado reduz o radical $ABTS^{•+}$ a uma intensidade e escala de tempo que depende da atividade antioxidante, da concentração e da duração da reação (Figura 12). À medida que o radical é reduzido à atividade antioxidante é determinada pelo descoloramento do ABTS presente no meio (RE et al., 1999; MOON e SHIBAMOTO, 2009).

Figura 12 - Formação do radical ABTS estável com o persulfato de potássio e reação com antioxidante



Fonte: Moon e Shibamoto (2009)

Essas reações transitam na doação de hidrogênio e apresenta baixa seletividade, logo dependendo do composto, como por exemplo, alguns polifenóis e produtos de origem animal, a reação com ABTS é muito lenta influenciando assim no resultado da capacidade antioxidante (SURVESWARAN et al., 2007).

2.6.2 Determinação de Fenólicos Totais

A quantificação dos compostos fenólicos totais pela metodologia que emprega o reagente de Folin-Ciocalteu baseia-se na redução dos ácidos fosfotungstíco ($H_3PW_{12}O_{40}$) e fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$), presentes no reagente de Folin-Ciocalteu (amarelo), pelos fenólicos constituintes na amostra a óxido de tungstênio (W_8O_{23}) e óxido de molibdênio (Mo_8O_{23}) em meio alcalino (Reação 6). Estes óxidos formados apresentam coloração azulada, sendo possível a quantificação da absorvância da solução na região do visível (725 nm) através de uma curva de calibração de ácido gálico (Figura 6) correlacionando a intensidade da cor à concentração de fenóis presentes na amostra, sendo o resultado expresso em equivalente de ácido gálico (EAG) (SINGLETON e ROSSI, 1965).

Reação 6-Reação do reagente Folin-Ciocalteu com compostos fenólicos



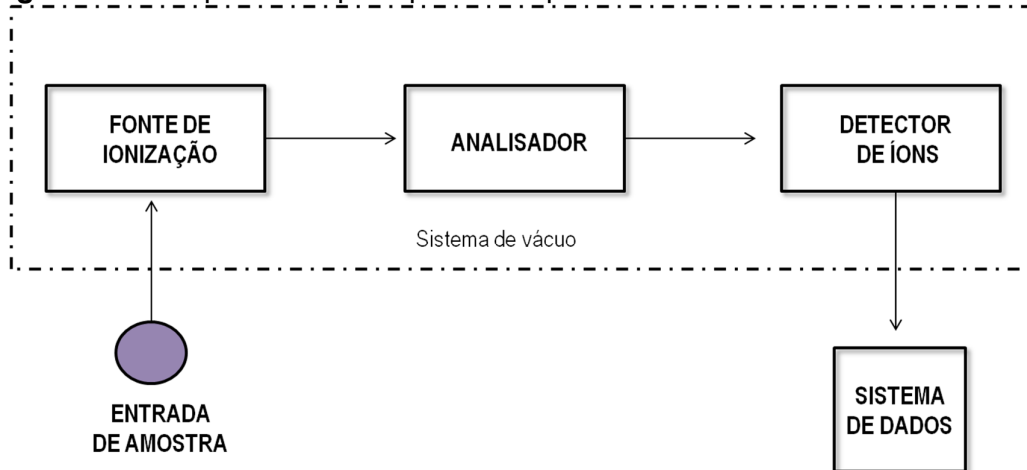
Fonte: Singleton e Rossi (1965)

2.6.3 Espectrometria de Massas

Dentre as diversas técnicas de identificação química de compostos, a espectrometria de massas tem se difundido às mais diversas áreas da ciência como Química Orgânica, Genética, Análises Clínicas, Metabolômica e entre outras. Essa técnica analítica é utilizada para identificar, quantificar e elucidar as propriedades químicas e estruturais de compostos, o qual concentrações baixas (ppt), quantidades de amostras (ao nível de picograma) em misturas ou isoladas possam ser analisadas (CROTTI et al., 2006).

O equipamento espectrômetro de massa constitui de três componentes principais: uma fonte de íons, analisador de massa e detector, Figura 13. Na fonte de íons, moléculas neutras ou íons da solução são transferidos para fase gasosa, e os íons formados são controlados pelo campo elétrico dos analisadores de massa por meio da diferença de potencial. O analisador de massa tem a função de separar esses íons de acordo com a sua relação *massa-carga* (m/z), visto que moléculas neutras não podem ser controladas, pois, apresentam ter movimentos aleatórios. Em seguida, o detector transforma a corrente de íons em sinais elétricos, íons estes que foram separados pelo analisador, para serem processados (HOFFMAN e STROOBANT, 2007).

Figura 13- Componentes principais do espectrômetro de massas



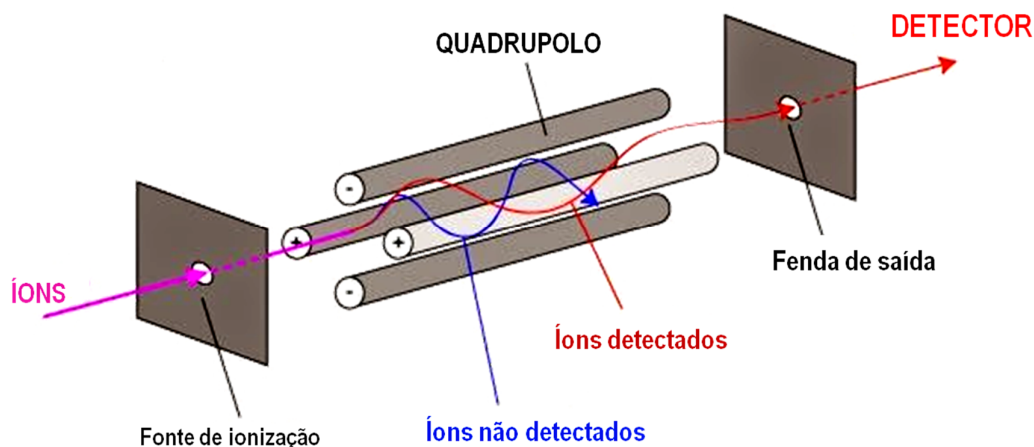
Fonte: O autor

Na espectrometria de massas o que define o tipo de equipamento é a forma como a molécula pode ser ionizada e o analisador. Uma

variedade de técnicas de ionização é usada, ionização por elétrons (EI), eletrospray (ESI), ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI), ionização química a pressão atmosférica (APCI) e entre outras (WATSON e SPARKMAN, 2008). A escolha da fonte de ionização é em relação às características físico-químicas do analito e a energia interna transferida durante o processo de ionização, pois técnicas de ionização podem ser muito enérgicas, por exemplo, EI, e causar extensas fragmentações ou mais suave, ESI, e só produzirem íons moleculares. A ionização por eletrospray (ESI) inicia-se em solução com adição de modificadores orgânicos (ácido fórmico, acetato de amônio, por exemplo) que promovem reações ácido-base. Posteriormente, a solução é bombeada através de um tubo capilar com alto potencial com o objetivo de separar as cargas dos compostos orgânicos formados (cátions e ânions) pelas reações ácido-base, ou seja, o tubo capilar promove reações de oxidação e redução dos compostos orgânicos. Finalmente, os íons presentes nas gotas carregadas são transferidos para a fase gasosa, possivelmente, por dois modelos evaporação de íons e/ou carga residual, os quais são direcionados através de campos elétricos atrativos para o interior do espectrômetro de massa (GROSS, 2004; HOFFMAN e STROOBANT, 2007; WATSON e SPARKMAN, 2008).

Existem diversos tipos de analisadores, por exemplo, TOF, Íon Trap, tempo de voo, mas o quadrupolo é comumente encontrado em laboratórios de pesquisas. Os analisadores quadrupolares, Figura 14, são construídos com quatro barras de aço alinhadas de forma paralela onde se aplicam potenciais elétricos que geram campos que permitem a passagem seletiva de íons entre as barras (FERGUSON, 1965). O princípio do analisador quadrupolar é medir a m/z por meio da estabilidade/instabilidade dos íons que passam por um campo elétrico tridimensional. Os íons são atraídos e repelidos durante a trajetória do campo elétrico e simultaneamente sendo focalizados no espaço entre as barras paralelas, pelo fato dos polos das barras se alternarem durante o caminho do feixe de íons (HOFFMAN e STROOBANT, 2007).

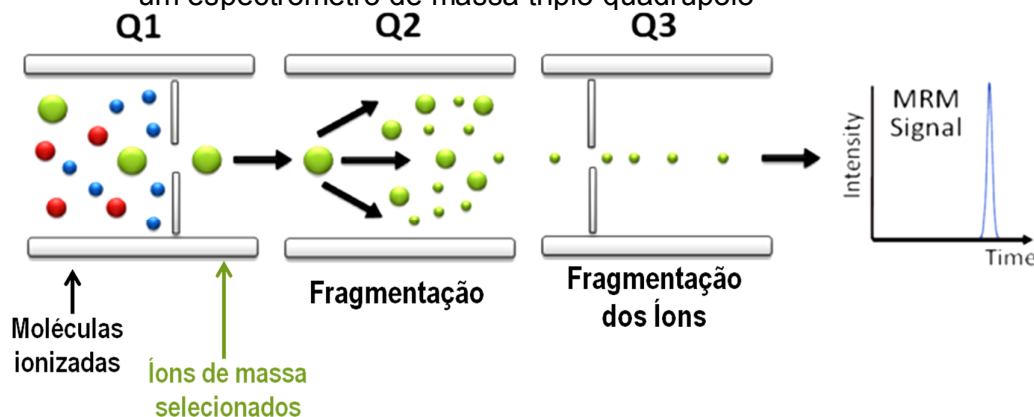
Figura 14- Esquema do analisador quadrupolo



Fonte: Adaptação de Danum (2017).

Outra aplicabilidade dos analisadores é a utilização como celas de colisão, ou seja, um gás neutro inerte (argônio, por exemplo) é introduzido nestas celas, contendo os íons formados, e a uma determinada energia de colisão acarreta reações de fragmentações, que podem dar informações estruturais, posteriormente esses íons são direcionados a outro analisador para leitura de m/z (GROSS, 2004). A técnica de monitoramento de reações múltiplas (MRM) é um modo de aquisição para a análise das fragmentações, os estágios de “filtragem” dos íons são empregados no espectrômetro de massas triplo-quadrupolares (QqQ), Figura 15 (GROSS, 2004; HOFFMAN e STROOBANT, 2007).

Figura 15 - Esquema de funcionamento de múltiplas reações monitoradas em um espectrômetro de massa triplo-quadrupolo



Fonte: Adaptado de Schmidt (2014)

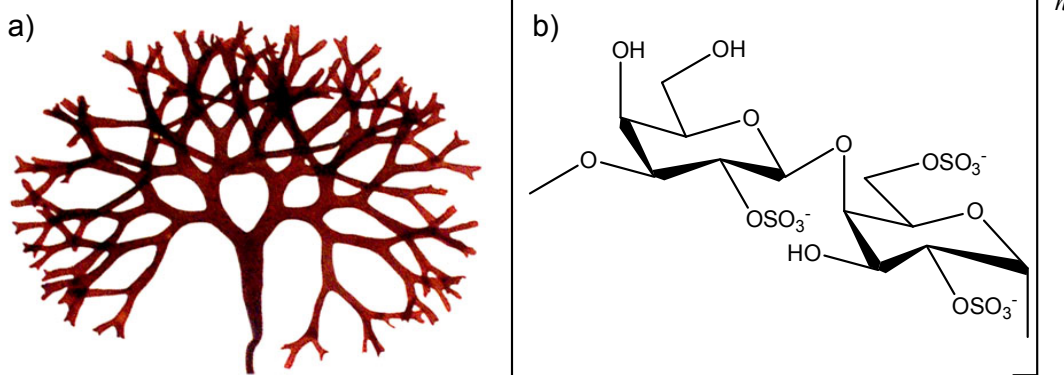
Durante a aquisição do modo MRM, moléculas ionizadas são introduzidas no primeiro quadrupolo, Q_1 , onde ocorre a seleção do íon de interesse. Posteriormente, os íons são induzidos para a câmara de colisão com um gás neutro em uma célula de colisão pressurizada (Q_2). Ao invés de obter o MS/MS de todos os possíveis íons de fragmentação, um pequeno número de íons específicos fragmentados é analisado no Q_3 . As vantagens da utilização dessa técnica é a alta seletividade, especificidade, quantificação, rapidez e sensibilidade da análise o que pode ser facilmente aplicada em áreas industriais (SCHMIDT et al., 2014; GILLETE e CARR, 2013.)

2.6.4 Carragenina

A carragenina é um polissacarídeo sulfatado extraído de alga vermelha, *Chondrus crispus* (Figura 16), encontrada ao longo das áreas rochosas da costa do Atlântico das Ilhas Britânicas, da Europa e América do Norte. Ela é composta de polímeros aniônicos lineares de 1, 3 α -1, 4 β -galactanos, que possuem por cada unidade dissacarídea, um sulfato de kappa (κ -), dois de iota (ι -) ou três de gama (λ -). Em soluções iônicas, κ - e ι - associam-se em estruturas helicoidais que forma géis rígidos ou flexíveis, enquanto a carragenina λ - não forma hélices e são não-gelatinosas (CARVALHO, 2008; VIERA, 2011).

A carragenina λ é comumente utilizada como agente de indução e estudo do processo inflamatório (VADIVELAN et al., 2007; VIEIRA, 2011). Os principais modelos de indução são inflamação aguda em pata de camundongos ou modelos de artrite. Winter, Risley e Nuss (1962) foram os primeiros que propuseram o uso da carragenina como agente irritante para indução de edema na pata e, posteriormente foi aceito ser o melhor modelo para indução da inflamação aguda *in vivo*.

Figura 16 - Alga vermelha *Chondrus crispus* (a) e estrutura química da carragenina λ (b)



Fonte: a) FAO (2017); b) Campos et al. (2009)

A resposta inflamatória induzida pela carragenina é caracterizada por uma resposta bifásica, com a formação de edema resultante da rápida produção de vários mediadores inflamatórios (MENDES et al., 2010). A fase inicial (60-90 minutos) é atribuída a uma libertação de histamina, serotonina e bradicinina, enquanto a fase tardia (4 - 6 horas) é devido a super produção de prostaglandina (OGONOWSKI et al., 1997). O pico de inflamação aguda com carragenina é em 4 horas pós-aplicação, nesse período o edema está mais acentuado e ocorre maior migração celular (MORRIS, 2003; CICALA et al., 2007).

A indução de carragenina como modelo inflamatório é eficaz, pelo fato de avaliar as várias etapas que ocorrem no processo inflamatório, seus mediadores e células envolvidos, além de testar novas drogas para futuros tratamentos de inflamação.

3 OBJETIVOS

Investigar os principais compostos do resíduo agroindustrial da casca da uva (*Vitis labrusca*) e avaliar a sua capacidade sequestradora de radical livre, além do seu efeito analgésico e anti-inflamatório em camundongos.

3.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Obter extratos a partir do bagaço da uva (*Vitis labrusca*);
- Determinar o extrato com maior potencial antioxidante e compostos fenólicos e flavonoides totais;
- Identificar os compostos bioativos presentes no extrato por espectrometria de massas;
- Avaliar a atividade analgésica e anti-inflamatória induzida por carragenina em camundongos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A Figura 17 apresenta o fluxograma dos métodos aplicados para avaliação do extrato bruto da casca da *Vitis labrusca*.

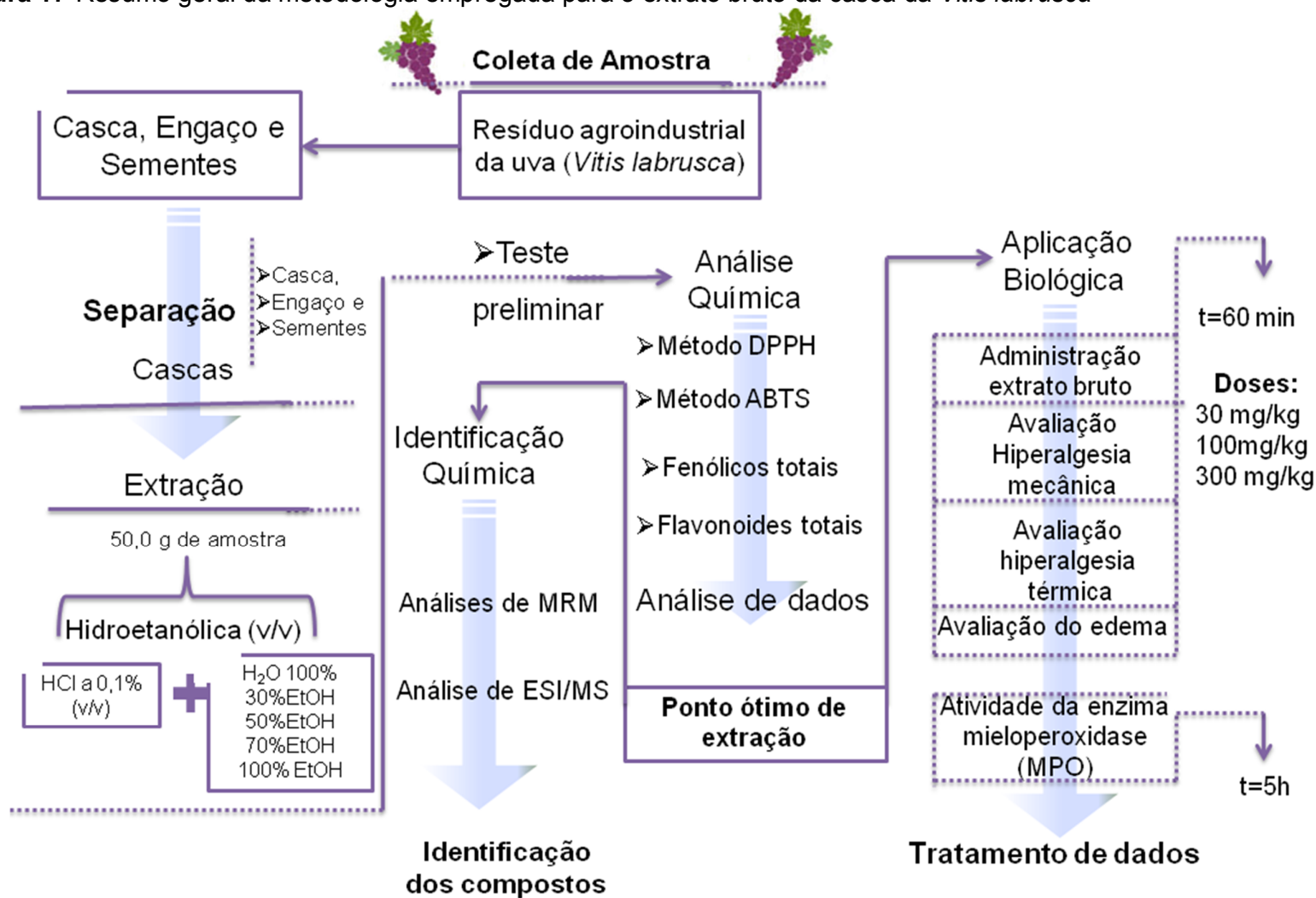
4.1 MATERIAL VEGETAL

O resíduo agroindustrial de uva, da espécie *Vitis labrusca*, foi fornecido pela Cooperativa Agroindustrial dos Viticultores (COAVITI), localizada no município de Marialva, Paraná (23°28'20.1"S 51°48'57.9"W), oriundas do município de Rolândia - PR. As sementes pertencentes ao bagaço eram derivadas dos cultivares de uva Isabel e Bordô da safra 2014/2015. O material vegetal coletado consistia de casca, engaço e sementes mantidas congeladas (-4°C) até o momento do preparo dos extratos.

4.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS

As amostras de uvas foram cuidadosamente separadas de forma manual em cascas e sementes. Os extratos foram preparados com 50,0 g de amostra, utilizando, como solventes extratores, as seguintes soluções hidroetanólica: 0, 30, 50, 70 e 100% (v/v), acidificados com HCl a 0,1% (v/v). As extrações (2 x 250 mL) foram submetidas a turbo extração (M Vithory) por 1 min, seguida de ultrassonicação (Ultranique Q3.8/40) com temperatura controlada (máximo 25°C) ao abrigo de luz no intervalo de 1 hora, posteriormente filtradas e armazenados em congelador (-4°C). A remoção do solvente foi por meio do evaporador rotativo (Thermo-RC1022) a 20°C e o extrato seco obtido (4,6% de rendimento) foi acondicionado em congelador (-4°C) e protegido da luz até a realização de todas as análises.

Figura 17-Resumo geral da metodologia empregada para o extrato bruto da casca da *Vitis labrusca*



Fonte: O autor

4.3 TESTE PRELIMINAR

Como teste preliminar para a seleção da melhor percentagem de solventes hidroetanólicos que apresentavam maior potencial bioativo, foram realizadas análises de atividade antioxidantes pelos métodos DPPH e ABTS, compostos fenólicos totais e flavonoides totais, metodologias descritas posteriormente nos itens 4.3.1 a 4.3.3, respectivamente. A amostra com maior potencial bioativo em relação a compostos fenólicos antioxidantes dentre os cinco extratos seguiram para a identificação química e aplicação biológica.

4.3.1 Atividade Antioxidante

4.3.1.1 Determinação da Atividade Antioxidante pelo Método de Seqüestro de Radicais Livres (DPPH)

A capacidade antioxidante foi avaliada utilizando o método do sequestro de radical livre DPPH (2,2 difenil-1-picrihidrazil), segundo Blois (1958).

Os extratos seco da *Vitis labrusca* em concentrações-mãe entre 8000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ a 5000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, foram diluídos para obter as concentrações de 7000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Alíquotas de 200 μL das diferentes concentrações foram adicionados à mistura reacional contendo 1 mL de tampão acetato 0,1M (pH 5,5), 1 mL de etanol e 0,5 mL de solução etanólica de DPPH (250 μM). A mudança na absorbância foi medida a 517 nm (Perkin Elmer Spectrometer Lambda 25) após 10 minutos de incubação em temperatura ambiente e ao abrigo de luz. O controle positivo foi preparado na ausência dos extratos, o controle de cor sem o DPPH e o branco preparado a partir da mistura reacional sem a solução DPPH e o extrato. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas.

4.3.1.2 Capacidade Sequestradora do Radical 2,2', azinnobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS⁺)

A capacidade sequestradora do radical ABTS⁺ foi realizada de acordo com Sánchez-Gonzalez e colaboradores (2005), com algumas modificações.

A solução ABTS foi preparada em meio aquoso para obtenção do cátion ABTS após a reação de 7 μM da solução ABTS com 2,45 μM de

persulfato de potássio, incubadas em geladeira por 16 h antes do uso. Posteriormente, diluiu-se a solução ABTS com tampão fosfato (pH 7,4, 0,1 M) até atingir uma absorvância de 0,7 a 0,8 em 730 nm. Alíquotas de 50 μL das concentrações 8000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ à 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ dos extratos secos da *Vitis labrusca* foram adicionado a 4 mL da solução ABTS⁺⁺ diluída. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Perkin Elmer Spectrometer Lambda 25) a 730 nm após 6 minutos de reação. O controle positivo foi preparado na ausência dos extratos, o controle de cor sem o reagente ABTS e o branco preparado a partir da mistura reacional sem a solução de ABTS. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas.

4.3.2 Compostos Fenólicos Totais

O conteúdo de polifenóis totais nos extratos foi determinado pelo método colorimétrico utilizando o Folin-Ciocalteu como reagente (KUMATZAWA et al., 2004; GEORGETTI et al., 2008) e o ácido gálico como padrão.

Primeiramente pesou-se cerca de 25 mg dos cinco extratos secos da *Vitis labrusca* e foram diluídos em 10 mL de acordo com a percentagem hidroetanólica inicial da extração. Alíquotas de 0,5 mL foi misturado com 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu e 0,5mL de Na_2CO_3 10%. Após 1 hora de incubação a temperatura ambiente, a absorvância foi medida a 760nm (Perkin Elmer Spectrometer Lambda 25). Uma amostra em branco foi conduzida nas mesmas condições e os resultados dos compostos fenólicos totais expressos em equivalente de ácido gálico ($y=0,03419x-0,03030$).

4.3.3 Flavonoides Totais

O conteúdo de flavonoides totais presente nos extratos foram determinados pelo método descrito por Rolim et al. (2005) com algumas modificações. Os extratos seco da *Vitis labrusca* nas concentrações de 2690 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ à 148 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ foram diluídas em solução de metanol:ácido acético 0,02 M (99:1). Adicionaram-se aos tubos de ensaio, 2 mL das soluções obtidas dos extratos e as leituras foram realizada em 361 nm em espectrofotometro UV-Vis

(Perkin Elmer Spectrometer Lambda 25). O resultado de flavonoides totais foi expresso em equivalente a rutina ($y=0,03085x-0,01457$).

4.4 IDENTIFICAÇÃO QUÍMICA

4.4.1 Instrumental

A identificação dos compostos fenólicos presente nas cascas do resíduo agroindustrial viticultor - Uva Isabel com Uva Bordô- foi realizada em espectrômetro de massas triplo-quadrupolo (QqQ) com ionização por eletrospray (ESI) em modo sequencial (ESI-tandem-MS) – Waters® e2795 Separations Modules no laboratório Fenn de Espectrometria de massas na UFPR- Campus Jandaia do Sul.

4.4.2 Preparo do Extrato para Análise em ESI/MS

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Ácido trifluoroacético (TFA), hidróxido de amônio (NH_4OH) e álcool metílico (Vetec, 99,9% a nível UV/HPLC), foram utilizados para preparo das soluções.

Uma alíquota de 4,5 mg do extrato de maior potencial bioativo, determinado nos itens 4.3.1 a 4.3.3, foram dissolvidas em 1 mL de álcool metílico, sonicadas durante 10 minutos (Unique, Ultra Cleaner 1400), centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos e filtradas com microfiltro de 0,22 μm . Posteriormente, esse extrato foi diluído de acordo com a fase móvel, ou seja, adição de modificador orgânico: TFA 0,1% e NH_4OH 0,1%, para o modo positivo e negativo, respectivamente e injetadas no equipamento de ESI/MS.

4.4.3 Condições de Múltiplas Reações Monitoras (MRM)

Os parâmetros de análises para MRM-ESI-MS para ionização no modo positivo foram: vazão de gás, Argônio, 0,14 mL.min⁻¹, temperatura da desolvatação, 250°C; capilar, 3500 V; cone, 30 V; energia de colisão, 30 V, vazão da seringa, 50 µL.min⁻¹, tempo de ciclo, 2 s; número de canais, 31. Para o modo negativo de ionização ocorreram: vazão de gás, Argônio, 0,14 mL.min⁻¹, temperatura da desolvatação, 250°C; capilar, 2500 V; cone, 40 V; energia de colisão, 30 V, vazão da seringa, 50 µL.min⁻¹, tempo de ciclo, 2,7s; número de canais, 27.

Para as condições de fragmentação no modo positivo, ESI-MS-MS, para delfinidina-3-glicosídeo foram: vazão de gás, Argônio, 0,14 mL.min⁻¹, temperatura da desolvatação, 250°C; capilar, 3500 V; cone, 30 V; energia de colisão, 15 V, resolução, 12; vazão da seringa, 50 µL.min⁻¹. Já para petunidina-3-glicosídeo e malvidina-3-glicosídeo ocorreram em: vazão de gás, Argônio, 0,14 mL.min⁻¹, temperatura da desolvatação, 300°C; capilar, 3500 V; cone, 30 V; energia de colisão, 30 V, resolução, 13; vazão da seringa, 50 µL.min⁻¹.

4.5 PROTOCOLO EXPERIMENTAL BIOLÓGICO

4.5.1 Animais

Os experimentos foram realizados em camundongos Swiss machos (20-25 g), provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina e mantidos no Biotério do Departamento de Ciências Patológicas da Universidade Estadual de Londrina pelo menos dois dias antes dos experimentos, utilizando ciclo de claro/escuro (12/12 h). Os animais foram divididos em gaiolas de polipropileno padrão medindo 41 x 34 x 16 cm (Insight®) no biotério de acordo com os grupos experimentais (máximo de 12 animais por gaiola), com livre acesso à água e ração e adaptaram-se aos ambientes e condições experimentais com pelo menos 1 hora de antecedência em relação aos experimentos. Os procedimentos de cuidado e manuseio de animais estavam de acordo com as diretrizes da Associação Internacional de Estudo da Dor (IASP), o qual passou pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual de Londrina para aprovação (número do protocolo 7534.2016.83).

4.5.2 Administração do Extrato Bruto da Casca da Uva (*Vitis Labrusca*)

Os animais foram pré-tratados por via oral com extrato bruto da casca da uva (*Vitis labrusca*, 20% Tween 80 em salina) que apresentou maior potencial bioativo obtido nos testes preliminares, itens 4.3.1 a 4.3.3. O extrato bruto foi homogeneizado com DMSO 2% em salina, nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg 60 min antes do estímulo intraplantar com carragenina (100 µg/animal, i. pl).

4.5.3 Avaliação da Hiperálgia Mecânica

A hiperálgia mecânica foi avaliada em camundongos pelo método de Von Frey, como já descrito previamente por Cunha e colaboradores, (2004). Em uma sala silenciosa, com temperatura controlada ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), os camundongos foram acomodados em caixas de acrílico com piso de grade metálica, 30 min antes do início do teste. Este teste consiste na aplicação de pressão pontual crescente na pata posterior do animal com uma ponteira de polipropileno (diâmetro de $0,5 \text{ mm}^2$) associada a um analgesímetro eletrônico (Insight®). A pressão necessária para evocar o movimento de retirada da pata pelo animal é registrada automaticamente em gramas (g). Os animais foram testados antes (basal) e em intervalos de 1, 3 e 5 h após o estímulo com carragenina (100 µg/animal, i.pl.) (CUNHA, 2005). Os resultados foram calculados através da diferença entre a média de 3 medições após o estímulo (1-5 h) e a média de 3 medições antes do estímulo (basal).

4.5.4 Avaliação da Hiperálgia Térmica

A hiperálgia térmica ao calor foi realizada utilizando uma placa quente à temperatura $55^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ (FATTORI, 2015). Os animais foram submetidos ao teste nos mesmos intervalos descritos para o experimento 4.5.3 e os resultados foram apresentados como valores de permanência (em segundos) na placa quente. O tempo máximo para permanência na placa quente foi de 20 s para evitar lesão tecidual.

4.5.5 Avaliação do Edema

As alterações no volume da pata foram determinadas utilizando auxílio de um paquímetro (medidor de espessura). A medida do volume da pata dos animais foi avaliada antes do estímulo (basal) inflamatório com carragenina (100 µg/animal, i.pl.) e nos intervalos de 1, 3 e 5h após. Os resultados foram calculados através da diferença entre a média de 2 medições após o estímulo e a média de 2 medições antes do estímulo (basal) (CONTE et al., 2008).

4.5.6 Medida da Atividade da Enzima Mieloperoxidase (MPO)

O ensaio para determinar a atividade da MPO foi utilizado como uma medida indireta da presença de neutrófilos no tecido plantar dos camundongos (CASAGRANDE et al., 2006). As amostras de tecido plantar subcutâneo foram coletadas 5 h após o estímulo com carragenina (100 µg, i.pl.) e colocadas em solução tampão de K₂HPO₄ (pH 6,0), contendo 0,5% de HTAB. As amostras foram homogeneizadas com auxílio de Polytron® (PT3100) e centrifugadas a (16100 xg, 4°C, 2 min) e o sobrenadante coletado. Brevemente, 10 µl de amostra do sobrenadante foram misturadas com 200 µl de solução tampão de fosfato 50 mM em pH 6,0, contendo 0,167 mg/ml de dihidroclorato de o-dianisidina e 0,015% de peróxido de hidrogênio. As absorbâncias das amostras foram registradas em espectrofotômetro de microplacas (ThermoScientific, MultiskanGO) em comprimento de onda de 450 nm. A atividade da MPO foi comparada a uma curva padrão de neutrófilos e o resultado expresso como atividade da mieloperoxidase (nº de neutrófilos x10⁴/mg tecido) (CASAGRANDE et al., 2006).

4.5.7 Análise Estatística

Os resultados dos parâmetros hiperalgésicos foram apresentados como média ± EPM (erro padrão da média) de mensurações

realizadas em 6 animais por grupo com 2 repetições. Utilizou ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Tukey para comparar os grupos e doses em todos os tempos (curvas). Para os demais ensaios os resultados foram apresentados como média \pm EPM (erro padrão da média). Empregou-se ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Tukey para experimentos com tempos específicos. Ambas as análises foram considerados diferenças significativas para $P < 0,05$.

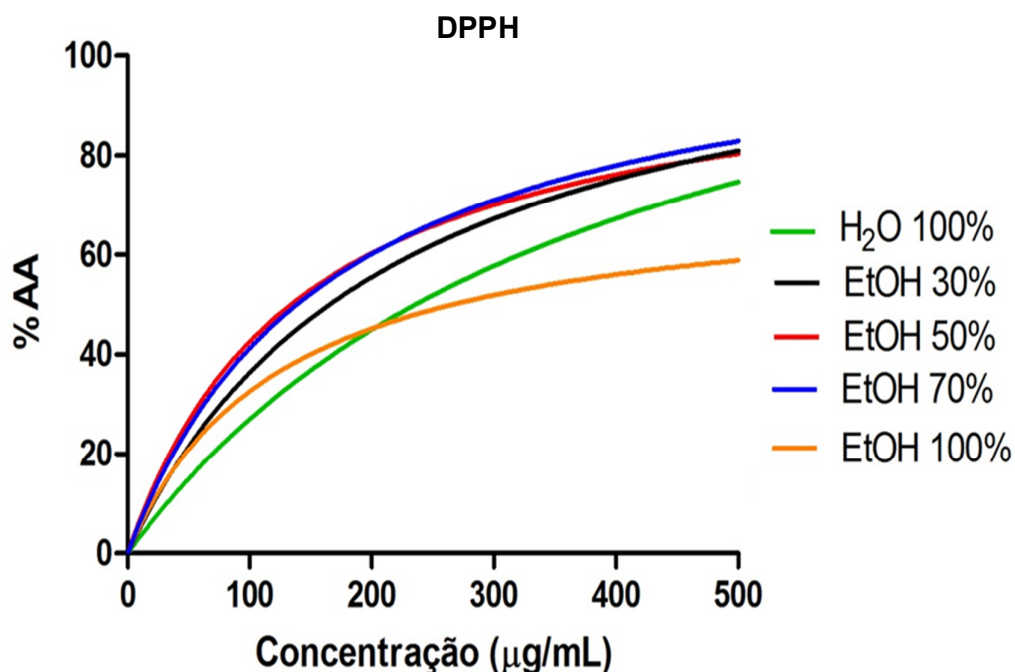
As concentrações dos extratos que reduziram os radicais livres em 50% (IC_{50}) foram determinados pelo software GraphPad Prism®, versão 5.01, utilizando curva hiperbólica (one site binding).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 TESTE PRELIMINAR

A seleção do melhor solvente extrator foi determinada pelos ensaios antioxidantes, compostos fenólicos e flavonoides totais, esta etapa teve o propósito de direcionar as análises de identificação química e atividade anti-inflamatória, para o extrato com maior potencial bioativo de caráter antioxidante. A percentagem de inibição da atividade antioxidante aniônica, DPPH, para os cinco extratos da *Vitis labrusca* estão expresso na Figura 18.

Figura 18- Inibição percentual da atividade antioxidante *in vitro* do extrato bruto para os cinco solventes extratores utilizados na *Vitis labrusca*



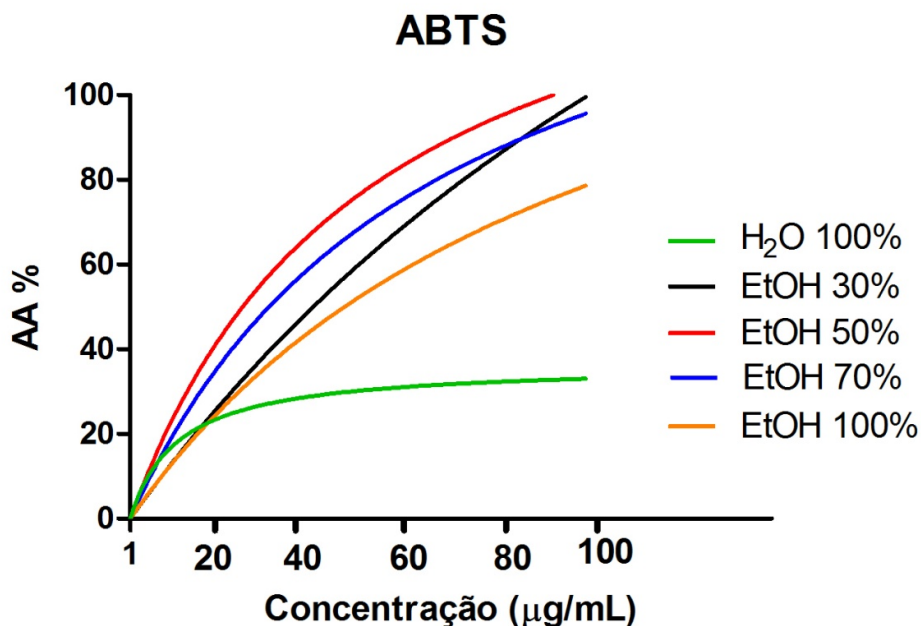
Os extratos na concentração de 400 µg.mL⁻¹ apresentaram um percentagem máxima de inibição entre 80% e 58%, para o extrato EtOH 70% e EtOH 100%, respectivamente. Após essa concentração, as curvas indicaram um início de platô no sequestro do radical livre pelos extratos, ou seja, independentemente do aumento da concentração de extratos a máxima inibição do radical livre DPPH será em 500 µg.mL⁻¹. Observa-se nas curvas de EtOH 70% e EtOH 50% um comportamento semelhante nas percentagens de inibição

no decorrer das concentrações estudadas. Já os extratos da *Vitis labrusca* que utilizaram os solventes H₂O 100% e EtOH 100%, apresentaram na concentração de 200 µg.mL⁻¹ um cruzamento nas curvas em aproximadamente 40% de inibição.

A resposta da capacidade de sequestro do radical DPPH é em relação à concentração de extrato e a percentagem de inibição em 50% (IC₅₀), isto é, quanto menor o IC₅₀ menor será a concentração de extrato necessária para inibir 50% do radical DPPH. Os maiores valores de IC₅₀ foram encontrados para os extratos EtOH 100% e H₂O 100%, os quais apresentaram 227 µg.mL⁻¹ e 235 µg.mL⁻¹, respectivamente. Os IC₅₀ de 162 µg.mL⁻¹, 147 µg.mL⁻¹ e 128 µg.mL⁻¹ são referentes aos extratos hidroetanólicos da *Vitis labrusca* EtOH 70%, EtOH 50% e EtOH 30%, respectivamente. Esses resultados indica que o aumento de H₂O na solução extratora possibilitou a extração de compostos com capacidade doadora de átomos de hidrogênio.

Outro método de atividade antioxidante foi aplicado aos cinco extratos, Figura 19, no intuito de observar a capacidade dos extratos em sequestrar o cátion radical ABTS^{•+}.

Figura 19- Capacidade antioxidante dos diferentes extratos bruto da *Vitis labrusca* para diferentes percentuais de água e etanol frente ao radical livre ABTS^{•+}



Os extratos apresentaram máxima inibição do radical em 100% com concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$. O extrato aquoso, na mesma concentração inibiu somente 38% do radical livre ABTS, assim maiores concentrações devem ser aplicadas para que a máxima inibição seja alcançada. O extrato EtOH 30% apresentou quase um comportamento linear em relação a percentagem de inibição correlacionadas com a concentração de extrato. As curvas de EtOH 70% e EtOH 50% tiveram o mesmo comportamento de inibição crescente, como também encontrado para o método DPPH.

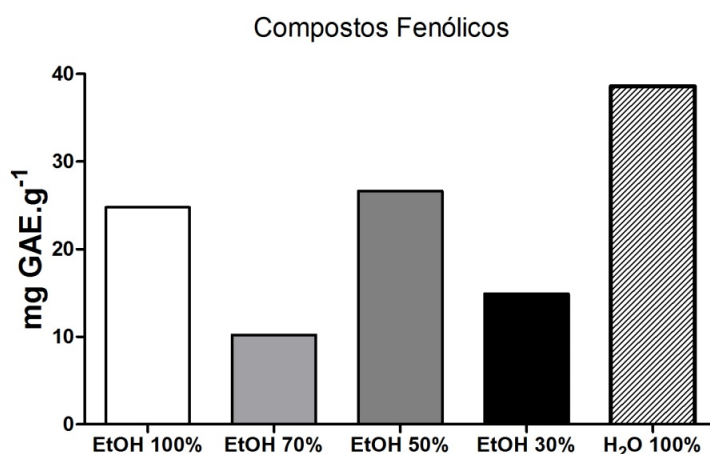
A capacidade antioxidante dos extratos frente ao método ABTS, como no método DPPH, foi expressa em valores de IC_{50} . Os extratos EtOH 100% e EtOH 30% apresentaram os maiores valores de concentração inibidora do radical livre ABTS, $45,94 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $47,70 \mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivamente. O IC_{50} do EtOH 70% foi de $30,47 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Já o EtOH 50% foi o extrato com melhor capacidade de reduzir radical livre em 50% com $27,76 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em comparação com os outros extratos testados. Em contrapartida, verificou-se que o extrato aquoso na maior concentração usada não atingiu o 50% de inibição de radical.

Observa-se que os dois métodos antioxidantes DPPH e ABTS apresentaram valores de IC_{50} distintos. Pelo fato do método DPPH consistir em receber um átomo de hidrogênio e o ABTS em sequestrar o cátion ABTS^{++} por meio das substâncias capazes de doar ou receber átomos e elétrons, o que explica maiores concentrações para DPPH em relação ao ABTS (SUCUPIRA et al., 2012).

Os teores dos compostos fenólicos totais para os extratos estão ilustrados na Figura 20. Observa-se que o extrato EtOH 70% apresentou a menor concentração de compostos fenólicos com $10,22 \text{ mgGAE.g}^{-1}$, seguido por $14,90 \text{ mgGAE}^{-1}$ para o extrato com EtOH 30%. Os extratos EtOH 100% e o EtOH 50% apresentaram $24,75 \text{ mgGAE.g}^{-1}$ e $26,62 \text{ mgGAE.g}^{-1}$ respectivamente. Já o extrato aquoso apresentou maior quantidade de fenólicos totais com $38,59 \text{ mgGAE.g}^{-1}$. Diversos autores, evidenciaram que extrações hidroalcoólicas confere uma quantidade de compostos fenólicos totais (ROCKENBACH et al., 2008; SPAGOLLA et al., 2009; SOUZA-SARTORI et al., 2013) e a concentração de polifenóis encontrada para o extrato aquoso consisti na presença de interferentes na extração da *Vitis labrusca*, por exemplo, ácido ascórbico

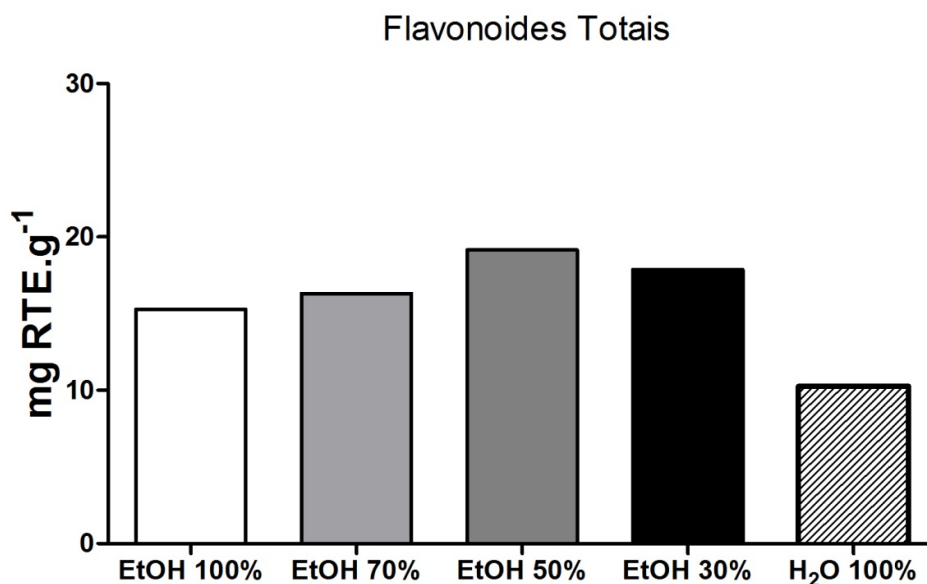
(EVERETTE, 2010), visto que o resíduo agroindustrial, principalmente, para produção de sucos, ocorre a adição de ácido ascórbico (EMBRAPA, 2007).

Figura 20- Quantificação dos compostos fenólicos totais para os cinco extratos bruto da casca da *Vitis labrusca*. Resultados expressos (no eixo y) em mg equivalentes de ácido gálico por grama de extrato (mg GAE⁻¹).



Em continuidade aos experimentos os teores de flavonoides totais foram inferiores a 20 mgRTE.g⁻¹ para os cinco extratos estudados, conforme ilustra a Figura 21. Observa-se que o extrato aquoso, o qual apresentou alto teor de compostos fenólicos, foi o que menor apresentou concentração de flavonoides, 10,27 mgRTE.g⁻¹, como supraescrito. O ácido ascórbico é um interferente no método de Folin-Ciocalteu e como a técnica não é seletiva, teores de fenólicos totais podem ser interpretados de forma equivocada. Contudo, os extratos obtidos com EtOH 100%, EtOH 70%, EtOH 50% e EtOH30%, mostraram teores de flavonoides totais de 15,29 mgRTE.g⁻¹, 16,32 mgRTE.g⁻¹, 19,15 mgRTE.g⁻¹ e 17,86 mgRTE.g⁻¹, o que corrobora com os resultados de compostos fenólicos totais. Outro fato que observado durante as análises e tratamento de dados é a proximidade dos teores quanto aos compostos fenólicos e flavonoides totais, por exemplo, o EtOH 30% com 14,898 mgGAE.g⁻¹ e 17,86 mgRTE.g⁻¹. Os sinergismos dos compostos presente nos extratos contribuíram de forma positiva na quantificação desses teores, visto que os extratos foram analisados na forma bruta, sem nenhum processo de purificação.

Figura 21- Quantificação flavonoides totais para os cinco extratos bruto da casca da *Vitis labrusca*. Resultados expressos (no eixo y) em mg equivalentes de rutina por grama de extrato (mgRTE^{-1}).



Finalmente, a partir de todos as análises preliminares e considerações o melhor solvente extrator para a casca residual da *Vitis labrusca* foi o extrato EtOH 50%. Todos os testes preliminares evidenciavam um ótimo comportamento em relação aos demais extratos, em relação à atividade sequestradoras de radicais livres, $147 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $27,76 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para DPPH e ABTS respectivamente, teor de compostos fenólicos $26,62 \text{ mgGAE.g}^{-1}$ e flavonoides totais $19,15 \text{ mgRTE.g}^{-1}$, presumivelmente aumentado a polaridade e extraíndo compostos bioativos promissores.

Melo e colaboradores (2011), avaliaram a composição fenólica e atividade antioxidante de três resíduos agroindustriais, entre eles o bagaço de uva Isabel extraído com etanol 80%, no estudo o bagaço da uva Isabel apresentou $16,57 \text{ mg GAE.g}^{-1}$ e $200 \mu\text{g/mL}$ para fenóis totais e atividade antioxidante (IC_{50}), respectivamente. Os resultados encontrados para o extrato EtOH 50% foram superiores ao encontrado por Melo e colaboradores (2011), diferenças entre safra, condições climáticas, peculiaridades de processamento e o método de extração interfere nos resultados de teor de polifenóis antioxidantes de materiais vegetais (Ruberto et al., 2007). Rockenbach e colaboradores (2011) quantificaram os compostos fenólicos em bagaços de uvas de três vinícolas diferentes e das variedades *Vitis labrusca* e *Vitis vinifera* e

obtiveram entre 32,62 a 74,74 mg GAE.g⁻¹. Já o teor de flavonoides totais, encontrados pelos autores, para a variedade Isabel apresentou 26,39 mg/100g resultados que não corroboram com extrato EtOH 50%, devido à utilização de metanol e liofilização, que apresenta maior eficiência de extração e concentração do analito, respectivamente, mas acarreta problemas de toxicidade e degradação de substâncias, por exemplo, antocianinas.

5.2 IDENTIFICAÇÃO QUÍMICA

O foco do presente estudo foi identificar os principais compostos fenólicos com potencial biológico no extrato EtOH 50% bruto da casca da *Vitis labrusca*. Dentre a identificação estão às antocianinas e os flavonóis apresentados na Tabela 03. Os compostos foram determinados através de duas injeções diretas no ESI/MS pela técnica MRM no modo positivo e negativo, de caráter qualitativo com um tempo máximo de análise de 2 minutos para cada injeção, evidenciando assim a rapidez na identificação (verificar Apêndices 1 a7).

Tabela 3- Dados de MRM para o extrato EtOH 50% da casca da *Vitis labrusca*.

Compostos	$[M-H]^+$ $[M-H]^-$ m/z	Apêndices
<i>Antocianinas^a</i>		
Peonidina-3-O-glicosídeo	463	Apêndice 3
Delfinidina-3-O-glicosídeo	465	Apêndice 4
Petunidina-3-O-glicosídeo	479	Apêndice 2
Malvidina-3-O-glicosídeo	493	Apêndice 1
Cianidina-3-O-p-coumaroil-glicosídeo	595	Apêndice 4
Peonidina-3-O-p-coumaroil-glicosídeo	609	Apêndice 3
Petunidina-3-O-p-coumaroil-glicosídeo	625	Apêndice 2
Malvidina-3-O-p-coumaroil-glicosídeo	639	Apêndice 1
Malvidina-3,7-O-diglicosídeo	655	Apêndice 1
<i>Flavonóis^b</i>		
Apigenina-7-glicosídeo	431	Apêndice 5
Luteolina-7-glicosídeo	447	Apêndice 5
Quercentina-3-galactosídeo	463	Apêndice 5
Isoramnetina-3-glicosídeo	477	Apêndice 6
Miricetina-3-rutinosídeo	627	Apêndice 6

^aIon modo positivo, antocianinas; ^bIon modo negativo, flavonóis

A técnica de múltiplas reações monitoradas (MRM) é um método de análise sensível em relação ao *full scan*, visto que apenas o íon e seu fragmento pré-selecionado são observados no analisador do espectrômetro de massas (IGLESIAS, 2016), sendo assim não foi possível obter todos os espectros de fragmentação dos compostos identificados em MRM, visto que os íons identificados apresentaram instabilidade.

A Tabela 4 apresenta os dados obtidos das fragmentações das antocianinas presentes no extrato hidroetanólico bruto da casca da *Vitis labrusca* (EtOH 50%).

Tabela 4- Dados de MS/MS para as antocianinas presente no extrato da *Vitis labrusca*.

Antocianina	[M-H] ⁺ m/z	MS/MS m/z	Apêndice
Delfinidina-3-O-glicosídeo	465	317	Apêndice 7
Petunidina-3-O-glicosídeo	479	303	Apêndice 8
Malvidina-3-O-glicosídeo	493	331	Apêndice 9

Os espectros de fragmentação (verificar Apêndice 7 a 9), foram obtidos para 3 antocianinas, petunidina-3-glicosídeo, delfinidina-3-glicosídeo e malvidina-3-glicosídeo, com íons característicos de 317 m/z, 303 m/z e 331 m/z, respectivamente, considerados majoritários dentre as antocianinas identificadas. Nas fragmentações, as antocianinas apresentaram perda da parte glicosídica (*m/z* 162) comum nas antocianinas, pelo fato de ser uma região de ligação passível de ocorrer reações de hidrólise, visto que a quantidade de elétrons envolvidos é menor em relação as ligações duplas e triplas, presente no anel pirano por exemplo, pelo fato da força de repulsão entre elas ser maior acarretando aumento da estabilidade da ligação (ATKINS, 2006). As antocianidinas formadas, malvidina, delfinidina e peonidina são comuns em subprodutos vinícolas visto que o processamento da uva faz com que as antocianinas sejam hidrolisáveis (MONRAD et al., 2010; SOUSA, 2015).

Ribeiro e colaboradores (2015) caracterizaram diferentes amostras de bagaço de uva – Cabernet Sauvignon, Merlot e uma mistura de Bordeaux (65%), Isabel (25%) e Terceira (10%) – e por meio da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massas identificaram 13 antocianinas, que incluiu as antocianinas-acetilglicosídicas. Além das antocianinas as amostras dessa mistura de bagaço indicaram a presença dos

ácidos fenólicos (ácido hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos), catequina, quercetina, rutina, kaempferol e *trans*-resveratrol, comumente encontrado em resíduos vinícolas.

Os compostos presentes nos resíduos agroindustriais vinícola são bastante elucidados na literatura. O emprego da técnica MRM no presente trabalho teve como foco rapidez e sensibilidade, visando possível aplicação industrial para determinar os compostos bioativos que são descartados em resíduos e assim ter um melhor aproveitamento e aplicação dessas substâncias.

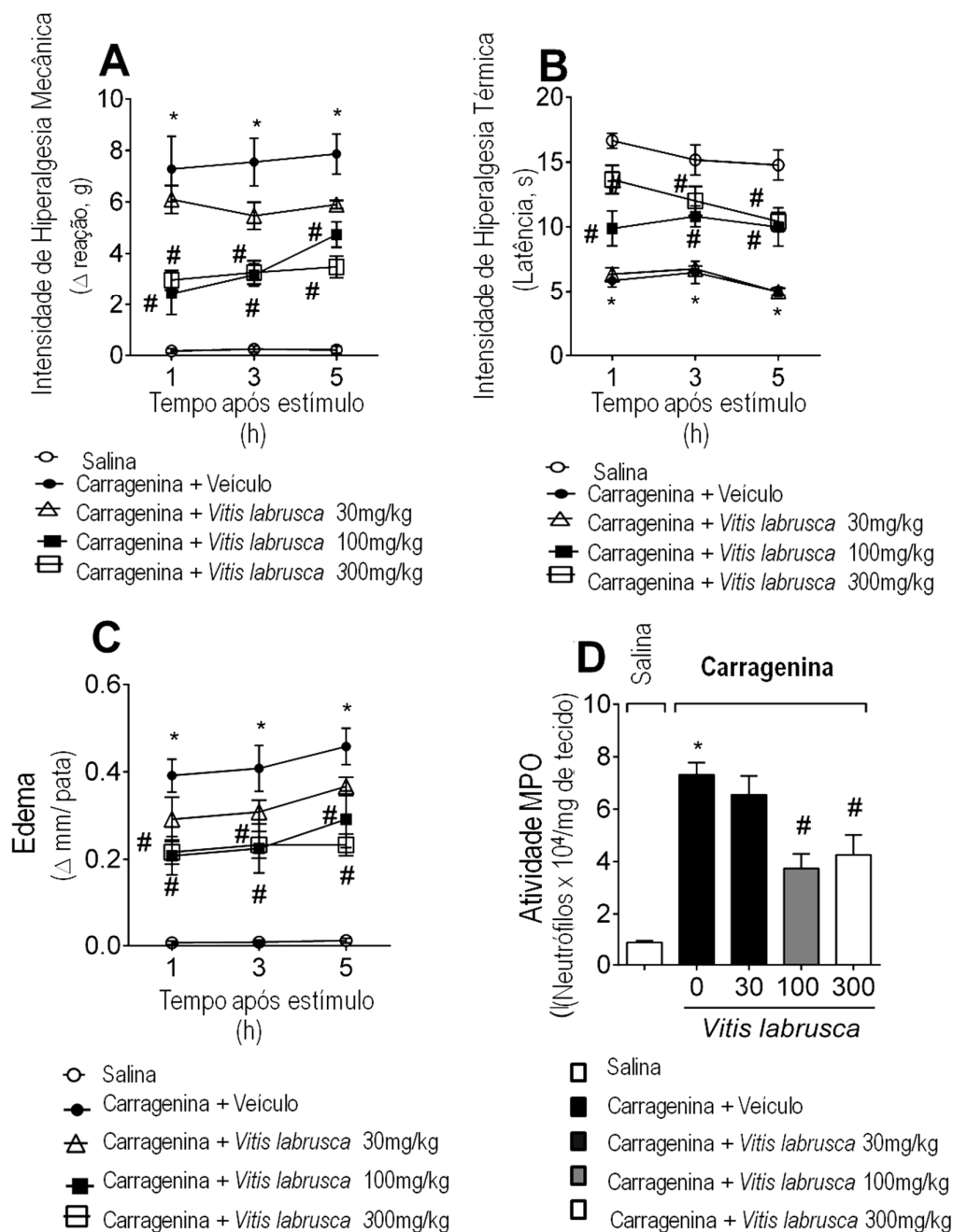
5.3 POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO E ANALGÉSICO *IN VIVO*

O extrato hidroetanólico (1:1, v/v) bruto da casca da *Vitis labrusca*, EtOH 50%, apresentou atividade analgésica e anti-inflamatória verificado com a inibição da hiperalgesia mecânica, hiperalgesia térmica, edema da pata, e atividade da enzima MPO, conforme a Figura 22.

A hiperalgesia mecânica e térmica induzida por carragenina inibiram a partir da primeira hora após o estímulo, Figura 22A e Figura 22B. As doses de 100 e 300 mg/kg do extrato da *Vitis labrusca* apresentaram diferença estatisticamente significativa ao grupo carragenina em todos os tempos (1, 3 e 5 h), enquanto a dose de 30 mg/kg não apresentou diferença significativa quando comparada ao grupo controle carragenina.

O extrato nas concentrações de 100 e 300 mg/kg administradas nos camundongos inibiram o edema da pata induzido por carragenina após a primeira hora, conforme ilustra a Figura 22C. Essas doses reduziram 50% do edema da pata quando comparadas ao grupo controle nos tempos de 1 e 3 horas. O grupo controle apresentou um edema da pata de aproximadamente 0,4 mm/pata e a dose de 30 mg/kg não apresentou estatisticamente diferenças significativas em todos os tempos (1, 3 e 5 h) em relação ao grupo controle. O estímulo de carragenina aumentou significativamente a atividade da enzima MPO após 5 horas (Figura 22D). As doses 100 e 300 mg/kg apresentaram diferenças significativas na atividade de MPO em relação a carragenina, sugerindo redução no recrutamento de neutrófilos.

Figura 22- Extrato hidroalcoólico (1:1) bruto da casca da *Vitis labrusca* reduz hiperalgesia mecânica, hiperalgesia térmica, edema plantar e recrutamento de neutrófilos induzidos por carragenina. O animais foram pré-tratados (1h) com as doses de 30, 100 e 300 mg/kg de *Vitis labrusca*. Após isso, os animais receberam estímulo com carragenina (100 µg/animal, i.pl.). A hiperalgesia mecânica (A), hiperalgesia térmica (B), edema plantar (C), e atividade da MPO (D) foram avaliados 1, 3 e 5 horas após a injeção de estímulo carragenina. Resultados expressos em média ± erro padrão da média ($n = 6$ por grupo experimental). * $p < 0,05$ vs. grupo salina. # $p < 0,05$ vs. grupo carragenina.



A dor de origem inflamatória resulta do aumento da excitabilidade (sensibilização) dos nociceptores periféricos decorrentes da estimulação de mediadores pró-inflamatórios. Após um estímulo com carragenina, uma cascata de citocinas pró-inflamatórias precede a liberação de aminas simpáticas e prostaglandinas E₂ (PGE₂) que levam a sensibilização dos nociceptores. Essa cascata inicia com a liberação da alarmina IL-33 (ZARPELON et al., 2013) a qual estimula a produção sequencial de TNF- α , IL-6, IL-1 β e PGE₂; e TNF- α , CXCL1, IL-1 β e aminas simpáticas (CUNHA et al., 2005; VERRI et al., 2006). Essas moléculas, ao se ligarem em seus receptores ativam kinases (PKA e PKC, por exemplo), que por sua vez fosforilam canais iônicos (TRPV1, TRPA1, Nav1.8; por exemplo) e ativam os nociceptores (BRAZ et al., 2014).

A presença de neutrófilos é um denominador comum no que se refere à dor inflamatória. Eles têm papel fundamental na manutenção da dor inflamatória (CUNHA et al., 2008). Neutrófilos recrutados produzem citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , TNF- α e IL-33 (VERRI et al., 2006). Desse modo, a depleção de neutrófilos (anticorpo anti-neutrófilo), inibição da migração dessas células (fucoidan), ou utilização de antagonistas do receptor de endotelina-1 reduzem a migração de neutrófilos e a hiperalgesia (CUNHA et al., 2008; FATTORI et al., 2016). Além disso, estratégias que visem à inibição do NF- κ B são altamente atrativas devido ao fato de as citocinas mencionadas serem dependentes do NF- κ B (GHOSH e HAYDEN, 2008). De fato, há diversos relatos da utilização de polifenóis com ação sobre esse fator de transcrição (CALIXTO-CAMPOS et al., 2015; FATTORI et al., 2015; VERRI et al., 2012).

Entender a estrutura dos compostos presentes em extratos ou substâncias isoladas é importantes no processo de busca de novos agentes anti-inflamatórios, isto esclarecerá como determinada estrutura vai interagir com o receptor, de acordo com os grupos funcionais presente na substância (THEOHARIDES et al., 2001). Dentre as substâncias identificadas no extrato hidroetanólico da casca da *Vitis labrusca*, as antocianinas e os flavonóis apresentam como característica comum um anel pirano C₆-C₃-C₆, como já ilustrada na Figura 8. A insaturação no anel C (posições 2-3), o número e a posição de grupamentos hidroxilas (por exemplo: padrão catecol no anel B, ou seja, 3',4'-di-hidroxilado da quercentina-3-galactosideo (Apêndice 5, pag, 91), a carbonila em C-4 (anel C) e a não glicosilação da molécula são fatores

estruturais importantes na atividade anti-inflamatória (COUTINHO et al., 2009).

A enzima MPO ativada desencadeia o processo de defesa imunológica ao tecido lesionado e espécies reativas, principalmente NO^* , são formadas e danos a células saudáveis são ocasionados. A partir das identificações químicas, e determinadas às estruturas, a compreensão quanto à resposta positiva na ação anti-inflamatória e analgésica do extrato bruto da *Vitis labrusca* é esclarecida. A deslocalização de elétrons π (π) gerada pela extensão de conjugação presente nas estruturas das antocianinas e flavonóis permitem uma maior estabilidade das espécies intermediárias formadas, o que favorece as reações químicas envolvidas (THEOHARIDES et al., 2001; COUTINHO et al., 2009). O anel B atua como eletrófilo, pois promove possibilidades para a ocorrência de oxidação enzimática, resultando na formação de espécies eletrofílicas capazes de sofrer adição nucleofílica (LOKE et al., 2008). A presença dessas antocianinas e flavonóis no extrato bruto da *Vitis labrusca* induz uma ação de sinergismo na resposta anti-inflamatória e analgésica no extrato, visto que o mesmo apresentou atividade antioxidante considerável, no qual elétrons ou hidrogênios foram doados aos radicais livres formados no processo inflamatório.

A análise de identificação química do extrato demonstrou que, petunidina-3-glicosídeo, delphinidina-3-glicosídeo e malvidina-3-glicosídeo são os compostos de maior predominância no extrato bruto da uva *Vitis labrusca*. De fato, a malvidina-3-glicosídeo reduz a atividade do NF- κ B através da inibição da degradação do I κ B *in vitro* (HUNG et al., 2014). Além disso, a malvidina-3-glicosídeo foi capaz de reduzir o edema de orelha e recrutamento de leucócitos para o foco inflamatório (PRUDENTE et al., 2013), sugerindo que os efeitos observados no presente trabalho são decorrentes da ação desta molécula. Ademais, o tratamento com extrato de uva, com identificação de compostos similares ao do presente trabalho, reduziu a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-6) e de PGE2 em leucócitos humanos (MOSSALAYI et al., 2014). Em conjunto esses mediadores são responsáveis pela ativação e sensibilização dos nociceptores e provocam dor. Considerando a importância do recrutamento de neutrófilos para o foco inflamatório, a redução dessas células observada no presente trabalho (verificada através da diminuição na atividade da MPO), pode explicar, em parte, o efeito analgésico do extrato de

uva *Vitis labrusca*. Corroborando, o tratamento com extrato hidroalcoólico de *Vitis vinifera* foi capaz de reduzir dor induzida em ambas às fases do teste da formalina e edema plantar induzido por carragenina (AOUEY et al., 2016). Esse é um dado interessante, visto que a dor induzida por formalina apresenta duas fases, uma neurogênica, mediada por TRPA1 (MCNAMARA et al., 2007) e uma inflamatória, mediada por citocinas pró-inflamatórias (CHICHORRO, LORENZETTI E ZAMPRONIO, 2004).

Considerando que no extrato bruto analisado há flavonoides, é de grande valia mencionar que essa classe de moléculas apresenta efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e analgésicos (VERRI et al., 2012). De fato, tratamento com quercetina (ANJANEYULU e CHOPRA, 2003; VALERIO et al., 2009; CALIXTO-CAMPOS et al., 2015; MAIOLI et al., 2015; BORGHI et al., 2016) e naringenina (MANCHOPE et al., 2016; PINHO-RIBEIRO et al., 2016) apresentam efeitos anti-inflamatório e analgésico em diversos modelos de dor (PINHO-RIBEIRO et al., 2016). Quin e colaboradores (2009) investigaram o efeito dos suplementos de antocianinas (80 mg/capsulas) derivados da baga da uva sobre o perfil lipídico sérico em 120 pacientes (idade de 40 a 65 anos) com dislipidemia. A cianidina-3-glicosídeo apresentou baixa atividade de CETP (proteína de transferência de colesterol esterificado) para as células hepáticas HepG2. Os autores também concluíram que a suplementação de antocianinas em humanos aumenta a concentração de colesterol LDL e HDL e aumenta o fluxo de colesterol celular ao soro. Portanto esses compostos majoritários encontrados no extrato bruto da *Vitis labrusca* além de apresentarem efeito analgésico e anti-inflamatório, não possui toxicidade significativa.

6 CONCLUSÃO

O solvente extrator EtOH 50% foi o mais eficaz na extração de compostos fenólicos com potencial capacidade sequestradora de radicais livres.

A técnica MRM foi eficiente na identificação química do EtOH 50% indicando a presença de antocianinas e flavónois, responsáveis pela atividade antioxidante do extrato.

O extrato EtOH 50% bruto da casca da *Vitis labrusca* possui ação analgésica e anti-inflamatória, e sua atividade biológica está relacionada, ao menos em parte, a sua atividade antioxidante.

Os resíduos vinícolas da *Vitis labrusca* são potentes fontes antioxidantes descartados durante a produção de sucos e vinhos. Diante disso, essa biomassa residual descartada pode ser considerada uma fonte barata e amplamente disponível para extração de compostos fenólicos e aplicados principalmente como forma de tratamentos alternativos a doenças inflamatórias e, conseqüentemente, gerar ganhos econômicos e minimizar impactos ambientais.

REFERÊNCIAS

- ALMAJWAL, A. M.; ELSADEK, M. F. Lipi-Lowering and hepatoprotective effects of *Vitis vinifera* dried seeds on paracetamol-induced hepatotoxicity in rats. **Nutr. Res. Pract.**, v.9, n.1, p. 37-42, 2015.
- ANDERSEN, O.M. JORDHEIM, M. The anthocianins. In. Andersen, O. M.; Kenneth, R.M. **Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications**. 1 ed. Taylor and Francis Group, 2006, p.1221.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos- Uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n.1, p. 232-240, 2007.
- ANJANEYULU, M.; CHOPRA, K. Quercetin, a bioflavonoid, attenuates thermal hyperalgesia in a mouse model of diabetic neuropathic pain. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**.v. 27, p.1001-5, , 2003.
- AOUEY, B.; SAMET, A. M.; FETOUI, H.; SIMMONDS, M. S.; BOUAZIZ, M. Anti-oxidant, anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of grapevine leaf extract (*Vitis vinifera*) in mice and identification of its active constituents by LC-MS/MS analyses. **Biomed Pharmacother**. v.84, p.1088-1098, 2016
- ARAÚJO, G. X. Caracterização físico-química de sucos de uva artesanais da região sudoeste do Paraná. **Trabalho de Conclusão de Curso**, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2013.
- ARAÚJO, J. M. **Química de Alimentos: Teoria e Prática**. 4 ed. Viçosa: Editora UFV, 477, 2008.
- ARCHELA, E.; DALL'ANTONIA, L. H. Determinação de compostos fenólicos em vinho: uma revisão. **Semina: ciências exatas e tecnológicas**, v. 34,, n.2, p.193-210, 2013.
- ATKINS, P.; LORETTA, J. **Princípios de química: questionando a vida moderna e o meio ambiente**. 3ª ed. 968 p. Porto Alegre: Bookman, 2006.
- BABIOR, B. M. NADPH oxidase: an update. **Blood**, v. 93, p. 1464-1476, 1999.
- BADALOTTI, D. A. Compostos fenólicos e atividade antioxidante de sucos de uva Bordô, Concord e Isabel elaborados com uvas produzidas pelo sistema orgânico. **Trabalho de conclusão do curso**, Instituto Federal de Educação, Ciências e Tecnologia do Rio Grande do Sul, Bento Gonçalves, 2011.
- BAGCHI, D.; BAGCHI, M.; STOHS, S. J.; DAS, D. K.; RAY, S.D.; KUSYNSKI, C.A.; JOSHI, S.S.; PRUESS, H.G. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. **Toxicology**, v. 148, p. 187-197, 2000.
- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v.99, n.1, p.191-203, 2006.

BARREIROS, A.L.B.; DAVID, J.M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organism. **Química Nova**, v.29, p.113-123, 2006.

BATLOUNI, M. Anti-inflamatórios não esteroides: efeitos cardiovasculares, cérebro-vasculares e renais. **Arq.Bras. Cardiol**, v.94, p.522-529, 2010.

BATOT, G. MARTEL, C.; CAPDEVILLE, N.; WIENTJES, F.. MOREL, F. Characteriation of neutrophil NADPH oxidase activity reconstituted in a cell-free assay using specific monoclonal antibodies raised against cytochrome *b₅₅₈*. **Eur. J. Biochem.**, v. 234, p. 208-215, 1995.

BAXTER, R. A. Anti-aging properties of resveratrol: review and report of a potent new antioxidant skin care formulation. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v.7, p.2-7, 2008.

BENAVENTE-GARCIA, O.; CASTILLO, J.; MARIN, F. R.; ORTUNO, A.; DEL RIO, J. A. Uses and properties of citrus flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 45, p. 4505-4515, 1997.

BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use a stable free radical. **Nature**, Londres, v. 26, p. 1199-1200, 1958.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nature Immunol.**, v. 2, p. 907-916, 2001

BORGHI, S. M. et al. Quercetin Inhibits Peripheral and Spinal Cord Nociceptive Mechanisms to Reduce Intense Acute Swimming-Induced Muscle Pain in Mice. **PLoS One**. v.11, p.162-267, 2016.

BOTTI, S. C. C. F. Extração e caracterização do resveratrol do bagaço da uva, análise comparativa entre métodos de secagem e comprovação da análise biológica *In vivo* .**Dissertação de Mestrado**, Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza. São Paulo, 2016.

BOVOLENTA, Y. R. Uva 'Isabel': Perfil fenólico de cascas e sementes e influência sob a capacidade antioxidante e cor do suco após aplicação do ácido abscísico. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Estadual de Londrina, 2015.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.R.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **Lebensmittel Wissenschaft Technology**, v. 28, p.25, 1995.

BRAVO, M. N S. Caracterização química e Funcional de vinhos Moscatel portugueses. **Tese de Doutorado**. Universidade de Lisboa, 2008.

BRAZ, J. et al. Transmitting pain and itch messages: a contemporary view of the spinal cord circuits that generate gate control. **Neuron**, v.82, p.522-36, 2014

CABRITA, M. J.; RICARDO-DA-SILVA, J.; LAUREANO, O. Os compostos polifenólicos das uvas e dos vinhos. **1º Seminário Internacional de Vitivinicultura**. 2004, Lisboa. **Anais**. Lisboa:INIFAP, p.61-102, 2004.

CALIXTO-CAMPOS, C. et al. Quercetin Reduces Ehrlich Tumor-Induced Cancer Pain in Mice. **Anal Cell Pathol (Amst)**. v.2015, p.285-708, 2015.

CALIXTO-CAMPOS, C. et al. Vanillic Acid Inhibits Inflammatory Pain by Inhibiting Neutrophil Recruitment, Oxidative Stress, Cytokine Production, and NFkappaB Activation in Mice. **J Nat Prod**. v.78, p.1799-808, 2015.

CAMARGO, U. A.; MAIA, J. D. G. **Sistema de produção de uvas rústicas para processamento em regiões tropicais do Brasil**. Embrapa Uva e Vinho: Sistemas de Produção, 9 ISSN 1678-8761 Versão Eletrônica, dez. 2005.

CAMARGO, U.A. Variedade de uva. In: GUERRA et al. **Conhecendo o essencial sobre uvas e vinhos**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, p. 17-30, 2009.

CAMARGO, UMBERTO ALMEIDA. **Uva para processamento**. Disponível em: <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/livro/novas_cultivares_brasileiras_uva.pdf>. Acesso em: 11 de Jun. 2015.

CAMPO VL, KAWANO DF, DA SILVA JR DB, CARVALHO I. Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis - a review. **Carbohydrate Polymers**. v.77, p.167-180, 2009.

CAMPOS, L. Obtenção de extratos de bagaço de uva Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera*): parâmetros de processos e modelagem matemática. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.

CANIVEZI, R. **Os tipos de uva**. Disponível em: <<http://www.riecicanivezi.com.br/tipos-de-uvass/>>. Acesso em: 30 Ago. 2015

CARVALHO, C. M. Avaliação do emprego da fototerapia laser no processo inflamatório induzido por carragenina na articulação temporomandibular de rato. 164f. **Tese de doutorado**, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2008.

CASAGRANDE R.; GEORGETTI, S.R.; VERRI, W.A. JR.; DORTA, D.J.; DOS SANTOS, A.C.; FONSECA, M.J.. Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice. **J. Photochem Photobiol B**. v.84, p.21-7, 2006

CASAGRANDE, R. et al. Evaluation of functional stability of quercetin as a raw material and in different topical formulations by its antilipoperoxidative activity. **AAPS Pharm Sci Tech**.v.7, p.10, 2006.

CATALUÑA, E. **As uvas e os vinhos**. 2 ed. São Paulo: Globo, 1988, 207p.

CATANEO, C. B.; CALIARI, V.; GONZAGA, L. V.; KUSKOSKI, E. M.; FETT, R. Atividade antioxidante e conteúdo fenólico do resíduo agroindustrial da produção de vinho. **Semina: Ciências Agrárias**, v.29, p.93- 102, Londrina,PR, 2008.

CHICHORRO, J. G.; LORENZETTI, B. B.; ZAMPRONIO, A. R. Involvement of bradykinin, cytokines, sympathetic amines and prostaglandins in formalin-induced orofacial nociception in rats. **Br J Pharmacol**., v.141, p.1175-84, 2004.

CHUNG, E.Y.; KIM, B.H.; HONG, J.T.; LEE, C. K.; AHN, B.; NAM, S.Y. Resveratrol down-regulates interferon- γ -inducible inflammatory genes in macrophages: molecular mechanism via decreased STAT-1 activation. **J. Nutr.Biochem.** v.22, p.902–909, 2011.

CICALA, C., MORELLO, S., ALFIERI, A., VELLESCO, V., MARZOCCO, A.G. Haemostatic imbalance following carrageenan-induced rat paw oedema. **European J of Pharmac.** v. 577, p.156-161, 2007.

CONTE, F. P.; BARJA-FIDALGO, C.; VERRI JR., W. A.; CUNHA, F. Q.; ERA, G. A.; PENIDO, C.; HENRIQUES, M. G. M. O.. Endothelins modulate inflammatory reaction in zymosan-induced arthritis: participation of LTB₄, TNF- α , and CXCL-1. **J. Leukoc. Biol.** v.84, p.652-660, 2008.

CONTRERAS-CALDERÓN, J.; CALDERÓN-JAIMES, L.; GUERRA-HERNANDEZ, E.; GARCIA-VILLANOVA, B. Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruit from Colombia. **Food Research International**, v. 44, p.2047-2053, 2011.

COPELLI, E. V. Avaliação de *trans*-resveratrol em vinhos da cv.Cabernet sauvignon tratada com fitofos K plus. **Trabalho de Conclusão de Curso**. Centro Federal de Educação Tecnológica de Bento Gonçalves, 2005.

CORRÊA, C. B. Potencial antimicrobiano de resíduos agroindustriais sobre *Listeria monocytogenes*. 87f. **Dissertação de Mestrado**, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 3, p. 241-256, 2009.

CROTTI, A. E. M. et al. Espectrometria de massas com ionização por “electrospray”: processos químicos envolvidos na formação de ions de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química Nova**, v.29, n.2, p.287-292, 2006.

CUNHA, T. M. et al. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. **J Leukoc Biol.**v.83, p.824-32, 2008.

CUNHA, T. M.; VERRI JR., W. A.; VIVANCOS, G.G.; MOREIRA, I. F.; REIS, S.; PARADA, C.A.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.37,p.401-407, 2004.

CUNHA, T.M. VERRI JR., W. A.; SILVA, J. S.; POOLE, S.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proc Natl. Acad.Sci.**, v.105, p.1755-1760., 2005

DANUM – Instrumental Analysis. Disponível em: <<https://danum74.wordpress.com/2014/05/15/espectroscopia-de-masas-2/>>. Acesso em 16 Jan. 2017.

DAVID, J.M. P.; DAVID, J. P; SANTOS, V. L. C.; SANTOS, M. L. S.; MOTA, M.

D. Resveratrol: Ações e benefícios à saúde humana. **Diálogos & Ciência**, ano V, n.10, 2007.

DE OLIVEIRA, D. A. Caracterização fitoquímica e biológica de extratos obtidos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) das variedades Merlot e Syrah. 211f. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

DEGASPARI, C. H.; WASZCZYNSKY, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, v.5, n.1, p.33-40, 2004.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 2ªed. Nottingham: John Wiley e Sons, 2002.

DUSSE, L. M. S., VIEIRA, L. M., CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. **Journal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003.

EMPRESA BRASILEIRA DE PEQUISA AGROPECUÁRIA- EMBRAPA. Suco de Uva. 1 ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2007, 45p.

EVERETTE, J. D. et al. Thorough Study of Reactivity of Various Compound Classes toward the Folin-Ciocalteu Reagent. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 14, p. 8139-8144, 2010.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Disponível: <http://www.fao.org/fi/common/format/popUplImage.jsp?xp_imageid=718110>. Acesso em 16 Jan. 2017.

FARAH, A.; DONANGELO, C.M. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal Plant Physiology**, Londrina, v. 18, n.1, p.23-26, 2006.

FATTORI, V. et al. Differential regulation of oxidative stress and cytokine production by endothelin ETA and ETB receptors in superoxide anion-induced inflammation and pain in mice. **J Drug Target**, p.1-27, 2016.

FATTORI, V.; PINHO-RIBEIRO, F. A.; BORGHI, S. M.; ALVES-FILHO, J. C.; CUNHA, T. M.; CASAGRANDE, R.; VERRI, W. A. JR. Curcumin inhibits superoxide anion-induced pain-like behavior and leukocyte recruitment by increasing Nrf2 expression and reducing NF-kappaB activation. **Inflamm Res**. v.64, p.993-1003, 2015

FERGUSON, R. E.; MCCULLOH, K. E.; ROSENSTOCK, H. M. **J. Chem. Phys.**, v.42, p.100, 1965.

FERREIRA, A. L. A., MATSUBARA L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 43, p. 61-68, 1997.

FERREIRA, A. L. Avaliação anti-inflamatória e antioxidante em ratos suplementados com uva (*Vitis vinifera* L.) na vigência de colite induzida por ácido

trinitrobenzenossulfônico. **Tese de Doutorado**. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

FERREIRA, T. I. L. Quantificação de antocianinas no fruto, polpa e produto processado da Juçara (*Euterpe edulis* Martius). **TCC**. Universidade de Taubaté, Taubaté, 2013.

FLANZY, C. **Enologia: Fundamentos científicos y tecnológicos**. 1ª ed. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, 2000.

FRANCIS, F. J.; MARKAKIS, P. C. Food colorants: anthocyanins. **Critical Reviews in Food Science & Nutrition**, v. 28, n. 4, p. 273-314, 1989.

GEORGETTI, S.R.; CASAGRANDE, R.; SOUZA, C.R.F.; OLIVEIRA, W.P. FONSECA, M.J.V. Spray drying of the soybean extract: Effects on chemical properties and antioxidant activity. **LWT – Food Science and Technology**. v.41, p.1521-1527, 2008.

GHOSH, S.; HAYDEN, M. S. New regulators of NF-kappaB in inflammation. **Nat Rev Immunol**. v.8, p.837-48, 2008.

GILLETE, M.; CARR, S. A. Quantitative analysis of peptides and proteins in biomedicine by targeted mass spectrometry. **Nature Methods**, v. 10, p. 28-34, 2013.

GOLDBERG, D. M.; NG, E.; KARUMANCHIRI, A.; DIAMANDIS, E. P.; SOLEAS, G. J. Resveratrol glucosides are important components of commercial wines. **American Journal of Enology and Viticulture**, 1996.

GROSS, J. H. **Mass spectrometry: a textbook**. 534 p. Springer, 2004.

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. **Nutr. Res.**, v.10, p-702-713, 2008.

HALLIWELL, B. Oxidative stress markers in pregnant women with preeclampsia. **The Lancet**, v.355, p.1179-1180, 2000.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**, 3ed. New York: Oxford University Press, 1999.

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LOLIGER, J.; AROUMA, O.I. The characterization of antioxidants. **Food Chem. Toxicol.**, v, 33, p. 601, 1995.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C.; CROSS, C. E. Free radicals , antioxidants, and human disease: where are we now?. **J. Lab. Clin, Med**, v.119, p.598, 1992.

HARMAN, D. Free radical theory of aging. **Mutation Research**, v.275, p.257-266, 1992.

HARVEY, A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. **Drug Discov. Today**, v.5, p 294-300, 2000.

HENSLEY, K.; ROBINSON, K.A.; GABBITA, S.P.; SALSMAN, S.; FLOYD, R. A. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. **Free Radic. Biol. Med.**, v.28, p.1456-1462, 1995.

HO, C. T., RAFI, M. M., GHAI, G. Substâncias bioativas: Nutracêuticas e tóxicas. In S. DAMODARAN, K. L. PARKIN, & O. R. FENNEMA (Eds.), **Química de alimentos de Fennema**, 4 ed., pp. 585–609. Porto Alegre: Artmed, 2010.

HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. **Mass spectrometry: principles and applications**. 3ª ed. 502 p. John Wiley and sons, 2007.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.1841-1856, 2005.

HUANG, W.; LIU, Y.; WANG, J.; WANG, X.; LI, C. Anti-Inflammatory effect of the blueberry anthocyanins malvidin-3-glucoside and malvidin-3-galactoside in endothelial cells. **Molec.**v.19, p.12827-12841, 2014.

HUSAIN, S.R. CILLARD, P. **Phytochemistry**, 1987, 26, 2489.

IGLESIAS, A. H. Introdução ao acoplamento cromatografia líquida: espectrometria de massas. Disponível em: <<http://www.cnpsa.embrapa.br/met/images/arquivos/17MET/minicursos/introducao%20ao%20acoplamento%20cromatografia%20liquida%20-%20espectrometria%20de%20massas.pdf>>. Acesso em 16 Nov. 2016.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Levantamento Sistemático da produção agrícola. Rio de Janeiro, v.29, n.1, p.1-83, 2015.

JANIKUES, A. G. P.R.; LEAL, V. O.; MOREIRA, N.X.; SILVA, A. A. M.; MAFRA, D. Compostos fenólicos e DRG. **Nutrire: rev., Soc. Bras. Alim. Nutr.= J. Brazilian Soc. Food Nutr.**, São Paulo, v. 38, n. 3, p. 322-337, Dez 2013.

JEANDET, P.; BESSIS, R.; GAUTHERON, B. The production of resveratrol (3,5,4-trihydroxystilbene) by grape berries in different developmental stages. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.42, p.41-46, 1991.

JESUS, W. M. M.; CUNHA, T. N. Estudo das propriedades farmacológicas da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reissek) e de duas espécies adulterantes. **Revista Saúde e Desenvolvimento**. v.1, p.20-47, 2012.

JORDÃO, A. M. Estrutura e composição das proantocianidinas da uva. Evolução ao Longo da Maturação. **Instituto Politécnico de Viseu**. Relatório 19, 2000.

KATALINIC, V.; MOZINA, S.S.; SKROZA, D.; GENERALIC, I.; ABRA MOVIC, H.; MILOS, M.; LJUBENKOV, I.; PISKERNIK, S.; PEZO, I.; TERPINC, P.; BOBAN, M. Polyphenolic Profile, Antioxidant Properties and Antimicrobial Activity of

Grape Skin Extracts of 14 *Vitis vinifera* Varieties Grown in Dalmatia (Croatia). **Food Chemistry**, v. 119, p. 715-723, 2010.

KEDAGE, V.V., TILAK, J.C., DIXIT, G.B., DEVASAGAYAM, T.P., MHATRE, M. Study of antioxidant properties of some varieties of grapes (*Vitis vinifera* L.). **Crit Rev Food Sci Nutr**. v.47, n. 2, p. 175-185, 2007.

KENNEDY, J. A. Grape and wine phenolics: Observations and recent findings. **Ciencia e Investigación. Agraria**, v. 35, p. 107-120, 2008.

KUMATZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chem**. v.84,p.329-339, 2004.

KVIECINKSI, M. R. Avaliação das atividades antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral do extrato bruto hidro-etanólico e frações de *Bidens pilosa* L. (Asteraceae). **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

LO, L. C.; WEIERGANG, I.; BONHAM, C.; HIPSKIND, J.; WOOD, K.; NICHOLSON, R. L. Phytoalexin accumulation in sorghum: identification of a methyl ether of luteolinidin. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. v.49, p.21-31, 1996.

LOKE, W. M.; PROUDFOOT, J. M. STEWART, S.; MCKINLEY, A. J; NEEDS, P. W.; KROON, P. A; HODGSON, J. M.; CROFT, K. D. Metabolic transformation has a profound effect on anti-inflammatory activity of flavonoids such as quercetin: lack of association between antioxidant and lipoxygenase inhibitory activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 75, n.5, p.1045-1053, 2008.

LUNARDI, F., LIMA, J.H.C., ASSREUY, J. Comparative study of respiratory burst induced by phorbol ester and zymosan in human granulocytes. **Clin. Biochem**. v.39: p.78-85, 2006.

MACHEIX, J. J.; SAPIS, J. C.; FLEURIET, A. Phenolic compounds and polyphenol oxidase in relation to browning in grapes and wines. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 30, n. 1, p. 441-486, 1991.

MAIOLI, N. A. et al. The superoxide anion donor, potassium superoxide, induces pain and inflammation in mice through production of reactive oxygen species and cyclooxygenase-2. **Braz J Med Biol Res**. v.48, p.321-31, 2015.

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

MALACRIDA, C. R.; DA MOTTA, S. Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.4, p.659-664, 2005.

MANACH, C.; MAZUR, A.; SCALBERT, A. Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. **Current Opinion in Lipidology**, London, v. 16, p. 77-84, 2005.

MANCHOPE, M. F. et al. Naringenin Inhibits Superoxide Anion-Induced Inflammatory Pain: Role of Oxidative Stress, Cytokines, Nrf-2 and the NO-cGMP-PKG-KATPChannel Signaling Pathway. **PLoS One**. v.11, 0153-015, 2016.

MARTIN, J. G. P. Atividade antimicrobiana de produtos naturais: erva-mate e resíduos agroindustriais. 100f. **Dissertação de Mestrado**, Universidade de São Paulo- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2011.

MATHIAS, João. A produção da fruta poderá ser direcionada para o consumo in natura ou para a fabricação de sucos e vinhos. **Revista Globo Rural**, 296 ed., Jun. 2010.

MAZZA, G. Anthocyanins in grapes and grape products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 35,, p.341-371, 1995.

MCNAMARA, C. R. et al. TRPA1 mediates formalin-induced pain. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v.104, p.13525-30, 2007.

MELLO, J. P. C.; SANTOS, S. C. **Em Farmacognosia: da planta ao medicamento**.3ª ed. Porto Alegre: UFSC, 2001.

MELO, P. S. Composição química e atividade biológica de resíduos agroindustriais. **Dissertação de mestrado**, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2010

MELO, P. S.; BERGAMASCHI, K.B.; TIVERON, A.P.; MASSARIOLI, A.P.; OLDONI, T.L.C.; ZANUS, M.C.; PEREIRA, G.E.; ALENCAR, S.M. Composição fenólica e atividade antioxidante de resíduos agroindustriais. **Ciência Rural**, v.41, n.6, p. 1088-1093, 2011.

MENDES, S.S. et al. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, p. 391-397, 2010.

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

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radicals diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin Journal of Food Science and Technology**, n.2, v.26, p.211-219, 2004.

MONRAD, J. K.; HOWARD, L.R.; KING, J.W.; SRINIVAS, K.; MAUROMOUSTAKOS, A. Subcritical solvent extraction of anthocyanins from dried red grape pomace. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 2862-2868, 2010.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAUJO, E. L. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química nova**. v.28, n. 5, p.892-896, 2005.

MONTORO, P.; BRACA, A.; PIZZA, C.; DE TOMMASI, N. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids isolated from different plant species. **Food Chemistry**, v.24, p.105-111, 2004.

MOON, J.K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant assays for plant and food components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.57, p. 1655-1666, 2009.

MORRIS, C.J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. **Methods in Molecular Biology**, v. 225, p. 115-121, 2003.

MOSSALAYI, M. D.; RAMBERT, J.; RENOUF, E.; MICOULEAU, M.; MÉRILLON, J. M. Grape Polyphenols and própolis mixture inhibits inflammatory mediator release from human leukocytes and reduces clinical scores in experimental arthritis. **Phytomedicine**,v.21, p.290-297, 2014.

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

MUÑOZ-ESPADA, A. C.; WOOD, K. V.; BORDELON, B.; WATKINS, B. A. Anthocyanin quantification and radical scavenging capacity of Concord, Norton, and Marchal Foch grapes and wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p.6779-6786, 2004.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature: insight review articles**, v.420, p.846-852, 2002.

OGONOWSKI, A.A. et al. Anti-inflammatory and analgesic activity of an inhibitor of neuropeptide amidation. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 280, p. 846-853, 1997.

OLDONI, T. L. C. Prospecção e identificação de compostos bioativos de subprodutos agroindustriais. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo, 2010.

OLIVEIRA, D. A. Caracterização fitoquímica e biológica de extrato obtidos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) das variedades Merlot e Syrah. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2010.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v.3, n.4, p.146-152, 2012.

PIETA,P. Flavonoids as antioxidants. **J. Nat. Prod.**,v. 63, p.1035-1042, 2000.

PINHO-RIBEIRO, F. A. et al. Naringenin reduces inflammatory pain in mice. **Neuropharmacology**. v.105, p.508-519, 2016.

PRIOR, R.L.; WU, X.; SCHAICH, M, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p.4290-4302, 2005.

PRUDENTE, A.; LODDI, A. M.; DUARTE, M. R.; SANTOS, A. R.; POCHAPSKI, M. T.; PIZZOLATTI, M. G.; HAYASHI, S. S.; CAMPOS, F. R.; PONTAROLO, R.; SANTOS, F. A.; CABRINI, D. A.; OTUKI, M. F. Pre-clinical anti-inflammatory aspects of a cuisine and medicinal millennial herb: malva sylvestris L. *Food Chem. Toxicol.* v.58, p.324-331, 2013.

QUIN, Y.; XIA, M.; MA, J.; HAO, J. LIU, J. MOU, H.; CAO, L.; LING, W. Anthocyanin supplementation improves serum LDL-and HDL-cholesterol concentrations associated with the inhibition of cholesteryl Ester transfer protein in dyslipidemic subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* v.90, p.485-492, 2009

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

REGINA, M. A. et al. **Viticultura e enologia: atualizando conceitos.** Caldas: EPAMIG-FECD, 2002.

RIBEIRO, L. F.; RIBANI, R. H.; FRANCISCO, T. M. G.; SOARES, A. A.; PONTAROLO, R.; HAMINIUK, C. W. I. Profile of bioactive compounds from grape pomace (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) by spectrophotometric, chromatographic and spectral analyses. *J. Chromatogr. B.* v.1007, p.72-80, 2015.

RIBÉREAU-GAYON, P.; GLORIES, Y.; MAU JEAN, A.; DUBOUDIEU, D. **Handbook of Enology the Chemistry of Wine.** 2^a ed. England: Wiley, 2006.

RIZZON, L. A.; MIELE, A.; MENEGUZZO, J. Avaliação da uva cv. Isabel para a elaboração de vinho tinto. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.20, p. 115-121, 2000.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia: biotecnologia.** São Paulo: Premier, p. 157-160, 1997.

ROCKENBACH, I. I. Caracterização fenólica e antioxidante de subprodutos da vinificação. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

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, n. 1, p. 174-179, July 2011.

ROCKENBACH, I. I.; SILVA, G. L.; RODRIGUES, E.; KUSKOSKI, E.M.; FETT, R.; Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades Tannat e Ancelota. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 28, p. 238-244, 2008.

ROLIM, A.; MACIEL, C. P. M.; KANEKO, T. M.; CONSIGLIERI, V. O.; SALGADO-SANTOS, I. M. N.; VELASCO, M. V. R. Validation assay for total flavonoids, as

rutin equivalents, from *Trichilia catigua* Adr. Juss (Meliaceae) and *Ptychopetalum olachoides* Benthham (Olacaceae) commercial extracts. **J. AOC Inter.** v.88, p.1015–1019, 2005

RUBILAR, M.; PINELO, M.; SHENE, C.; SINEIRO, J.; NUÑEZ, M.J. Separation and HPLC-MS identification of phenolic antioxidants from agricultural residues: Almond hulls and grape pomace. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.10101-10109, 2007.

SAMPAIO, C. R. P. Caracterização físico-química, capacidade antioxidante e compostos biotivos de frutos de murici vermelho (*Byrsonima ligustrigolia* A. Juss.) em cinco estádio de maturação. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

SÁNCHEZ-GONZALEZ, I.; JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; SAURA-CALIXTO, F., 2005. In vitro antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (italian, espresso and filter). **Food Chem.** v.90, p.133-139, 2005.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal Science Food Agricultural**, v.76, p.270, 1998.

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

SANTOS, S. C.; MELLO, J. C. P. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. Florianópolis: Ed. da UFSC; Porto Alegre: Ed. da UFRGS, 2004. cap. 2. p. 29-43.

SAUTTER, C. K. et al. Determinação de resveratrol em sucos de uvas irradiadas. *In: Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia*, 10, Bento Gonçalves, 2003. **Anais...**Santa Maria, UFSM, p.212, 2003.

SCHMIDT, A. et al. Proteomanalyse und Systembiologie. **Biospectrum**, p.44-47, 2014.

SCHWARTZ, S. J.; VON ELBEE, J. H.; GIUSTI, M. M. Corants. In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 445-498, 2010.

SÉFORA-SOUSA, M; ANGELIS-PEREIRA, M.C. Mecanismos moleculares de ação anti-inflamatória e antioxidante de polifenóis de uvas e vinho tinto na aterosclerose. **Rev. Bras. Pl. Med**, v.15, p.617-626, 2013

SGARBI, M. W.; SILVA JUNIOR, B. A.; HUNGRIA NETO, J. S. Importância da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) no prognóstico dos pacientes politraumatizados. **Rev. Bras. Ortop.**,v. 41, p. 1-6, 2006.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best. Pract. Res. Clin. Anaesthesiol**, v. 18, n. 3, p- 385-445, 2004.

SHRIKHANDE, A.J. Wine by-products with health benefits. **Food Research International**, v. 33, p. 469–474, 2000.

SHUKLA, S.; MEHTA, A.; MEHTA, P.; VYAS, S. P.; SHUKLA, S.; BAJPAI, V. K. Studies on anti-inflammatory, antipyretic and analgesic properties of *Caesalpinia banducella* F. seed oil in experimental animal models. **Food. Chem. Toxicol.** v.48, p.61-64, 2010.

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

SILVA, F. L.N. Aplicação da espectrometria de massas na avaliação da composição química de vinhos e uvas. **Tese de Doutorado**. Universidade Estadual de Campinas, 2013.

SILVA, S. C.; SANTOS, A. P.; CRUZ, R. S. As propriedades anti-inflamatórias do cacau no processo aterosclerótico. **Alimentação Humana**, v.17, p. 55-63, 2011.

SIMOES, C. M. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª ed., 1104p. São Carlos: Editora da UFSC, 2010.

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

SINGLETON, V.L., ROSSI, J.R., Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-158, 1965.

SOARES, M.; WELTER, L.; KUSKOSK, E. M.; GONZAGA, L.; FEET, R. Compostos fenólicos e antioxidante da casca de uvas Niágara e Isabel. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n.1, p.59-64, 2008.

SOUSA, A. S. C. Perfil fenólico como parâmetro de distinção das castas da região do Dão. **Dissertação de Mestrado**, Universidade do Porto, Porto, 2015.

SOUZA, G. **Radicais livres no alvo**. Disponível em: <<http://cienciahoje.uol.com.br/revista-ch/revista-ch-2009/256/radicais-livres-no-alvo>>. Acesso em: 30 Ago. 2015.

SOUZA, J. S. I.de; MARTINS, F.P. **Viticultura brasileira: principais variedades e suas características**. v.9,. 368p. Piracicaba: FEALQ, 2002.

SOUZA, V. B. Aproveitamento dos subprodutos de vinificação da uva Bordô (*Vitis labrusca*) para obtenção de pigmentos com propriedades funcionais. **Dissertação de Mestrado**, Universidade de São Paulo, Pirassunga, 2013.

SOUZA-SARTORI, J. A.; SCALISE, C.; BAPTISTA, A. S.; LIMA, R. B.; AGUIAR, C. L. Parâmetros de influência na extração de compostos fenólicos de partes aéreas da cana-de-açúcar com atividade antioxidante total. **Biosci. J.**, v. 29, n.2, p.297-307, 2013.

SPAGOLLA, L. C.; SANTOS, M. M. PASSOS, L. M. L.; AGUIAR, C. L. Extração alcoólica de fenólicos e flavonoides totais de mirtilo "Rabbiteye" (*Vaccinium ashei*) e sua atividade antioxidante. **Rev. Cienc. Farm. Básica Apl.**, v.30, n.2, p.187-191, 2009.

STANGARLIN, J. R. KUHN, O. J.; TOLEDO, M. V., PORTZ, R. L.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. PASCHOLATI, S. F. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, v.10, n.1, p.18-46, 2010

SUCUPIRA, N. R.; SILVA, A. B.; PEREIRA, G.; COSTA, J. N. Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. **Unopar Cient. Ciênc. Biol. Saúde**. v.14, n.4, p.263-269, 2012.

SURVESWARAN, S. et al. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. **Food Chemistry**. v.102, p.938-953, 2007.

TERCI, D. B. L.; ROSSI, A. V. Indicadores naturais de pH: usar papel ou solução?. **Química Nova**, v. 25, n.4, p.684-688, 2002.

THEOHARIDES, T. C.; ALEXANDRAKIS, M.; KEMPURAJ, D.; LY TINAS, M. Anti-inflammatory actions of flavonoids and structural requirements for new design. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 14, p.119, 2001.

TUJIOS, S.; FONTANA, R. J. Mechanisms of drug-induced liver injury: from bedside to bench, **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v.8, n.4, p. 202-211, Apr 2011.

ULIANA, M.R. Caracterização química, energética, aromática e sensorial de vinhos de mesa de uvas americanas. 2013. 95 f. **Tese de Doutorado**. Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2013.

VADIVELAN S, SINHA BN, KALYAN SB, CHRISTINA AJM, RAKESH NP. Antiinflammatory activity of *Spermacoce articularis* Linn on Carrageenan induced paw edema in wistar male rats. **Pharmacologyonline**, v.3, p.478-484, 2007.

VALERIO, D. A. et al. Quercetin reduces inflammatory pain: inhibition of oxidative stress and cytokine production. **J Nat Prod**. v.72, p.1975-9, 2009.

VENDANA, M.I.S.; ZIEMER, C.; MIGUEL, O. G.; PORTELLA, A.; CANDIDO, L.M.B. Efeito do processamento na atividade antioxidante de uva. **Revista Alimentos e Nutrição**, v.19, n.2, p.159-165, 2008.

VERRI, W. A., JR. et al. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? **Pharmacol Ther**. v.112, p.116-38, 2006.

VERRI, W. A., Jr. et al. Flavonoids as Anti-Inflammatory and Analgesic Drugs: Mechanisms of Action and Perspectives in the Development of Pharmaceutical Forms. In: RAHMAN, A. U. (Ed.). **Studies in Natural Products Chemistry**. 1st. Amsterdam: Elsevier, v.36. cap. 9, p.297-330, 2012.

VIERIA, C. P. Estudo do efeito da inflamação em pata de rato induzida por carragenina sobre o tendão flexor digital profundo. 92f. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

WATSON, J. T.; SPARKMAN, O. D. **Introduction to mass spectrometry: instrumentation, applications and strategies for data interpretation**. 4ª ed. 861 p. John Wiley and sons, 2008.

WIESE, L. P. L. Avaliação de atividade antioxidante e antiinflamatória de extrato e frações de *Alternanthera tenella* Colla. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

WINTER, C.A.; RISLEY, E.A.; NUSS, G.W. Carrageenan-induced edema in hind paw of rats as an assay method for antiinflammatory drugs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, n.111, p.544-547, 1962.

WINTERBOURN, C. C.; VAN DEN BERG, J. J. M.; ROITMAN, E.; KUYPERS, F. A. Chlorohydrin formation from unsaturated fatty acids reacted with hypochlorous acid. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 296, p.547-555, 1992.

WU, S.; LONG, C. KENNELLY, E. Phytochemistry and health benefits of jaticaba, an emerging fruit crop from Brazil. **Journal Food Research International**, v.54, p.148-159, 2013.

XU, C., ZHANG, Y., CAO, L., LU, J. Phenolic compounds and antioxidant properties of different grape cultivars grown in China. **Food Chemistry**. v.119, p.1557-1565, 2010.

ZARPELON, A. C. et al. IL-33/ST2 signalling contributes to carrageenin-induced innate inflammation and inflammatory pain: role of cytokines, endothelin-1 and prostaglandin E2. **Br J Pharmacol**. v.169, p.90-101, 2013.

NATIVIDADE, M. M. P. Desenvolvimento, caracterização e aplicação tecnológica de farinhas elaboradas com resíduos da produção de suco de uva. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

PATINO, H. O. Utilização de bagaço de uva na alimentação de ruminantes. Disponível em: < <http://www.avindima.com.br/?p=7628>>. Acesso em 13 Fev. 2017.

APÊNDICES

Apêndice 1 - MRM do extrato hidroetanólico (1:1, v/v) bruto da casca da *Vitis labrusca* para malvidina-3-o-glicosídeo (493 m/z), malvidina-3-o-p-coumaroilglicosídeo (639 m/z) e malvidina-3,7-o-diglicosídeo (655 m/z) no modo positivo.

Apêndice 2- MRM do extrato hidroetanólico (1:1, v/v) bruto da casca da *Vitis labrusca* para petunidina-3-o-glicosídeo (479 m/z) e petunidina-3-o-p-coumaroilglicosídeo (625 m/z) para o modo positivo.

Apêndice 3- MRM do extrato hidroetanólico (1:1, v/v) bruto da casca da *Vitis labrusca* para peonidina-3-o-glicosídeo (463 m/z) e peonidina-3-o-p-coumaroilglicosídeo (609 m/z) para o modo positivo

Apêndice 4- MRM do extrato hidroetanólico (1:1, v/v) bruto da casca da *Vitis labrusca* para delphinidina-3-o-glicosídeo (465 m/z) e cianidina-3-o-p-coumaroilglicosídeo (595 m/z) para o modo positivo

Apêndice 5- MRM do extrato hidroetanólico (1:1, v/v) bruto da casca da *Vitis labrusca* para quercentina-3-o-galactosídeo (463 m/z), luteolina-7-o-glucosídeo (447 m/z) e apigenina-7-o-glucosídeo (431 m/z) para o modo negativo

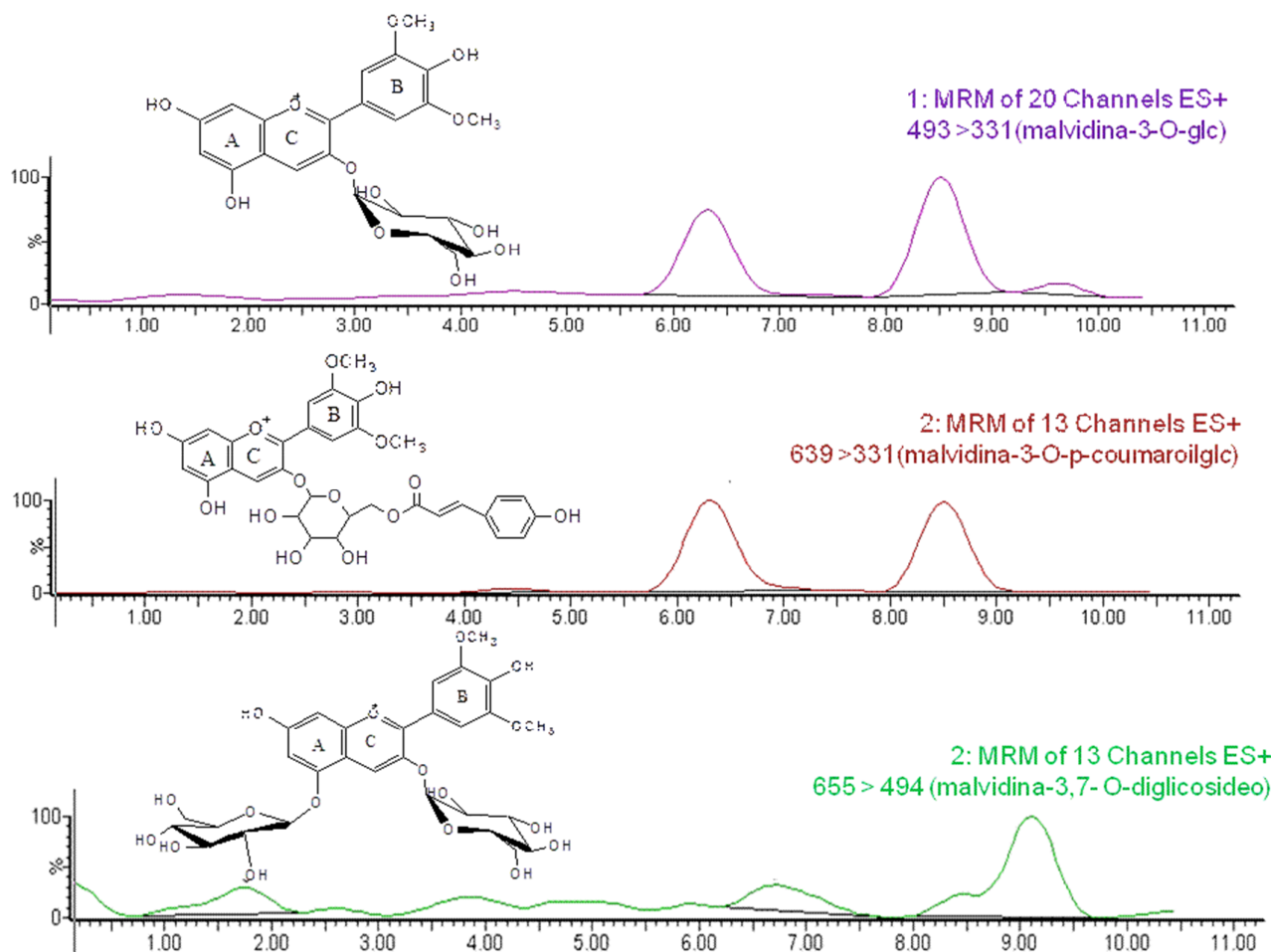
Apêndice 6- MRM do extrato hidroetanólico (1:1, v/v) bruto da casca da *Vitis labrusca* para isoramnetina-o-hexosídeo (477 m/z) e miricetina-3-o-rutinosídeo (627 m/z) para o modo negativo

Apêndice 7- Espectro de fragmentação da delphinidina-3-glicosídeo ESI-MS (+)

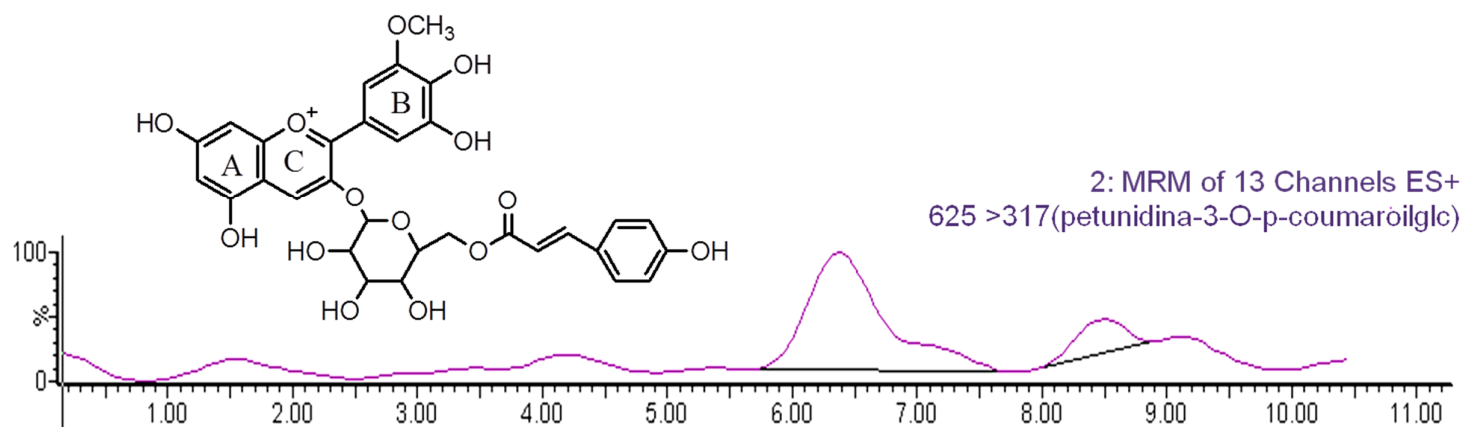
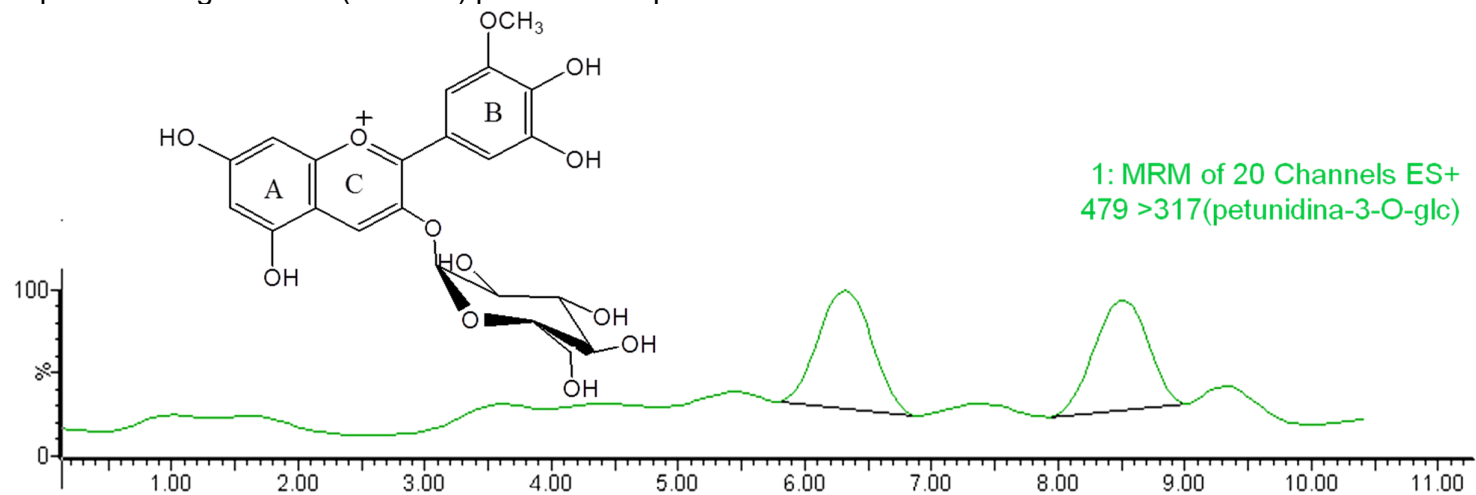
Apêndice 8-Espectro de fragmentação da petunidina-3-glicosídeo ESI-MS (+)

Apêndice 9- Espectro de fragmentação da malvidina-3-glicosídeo ESI-MS (+)

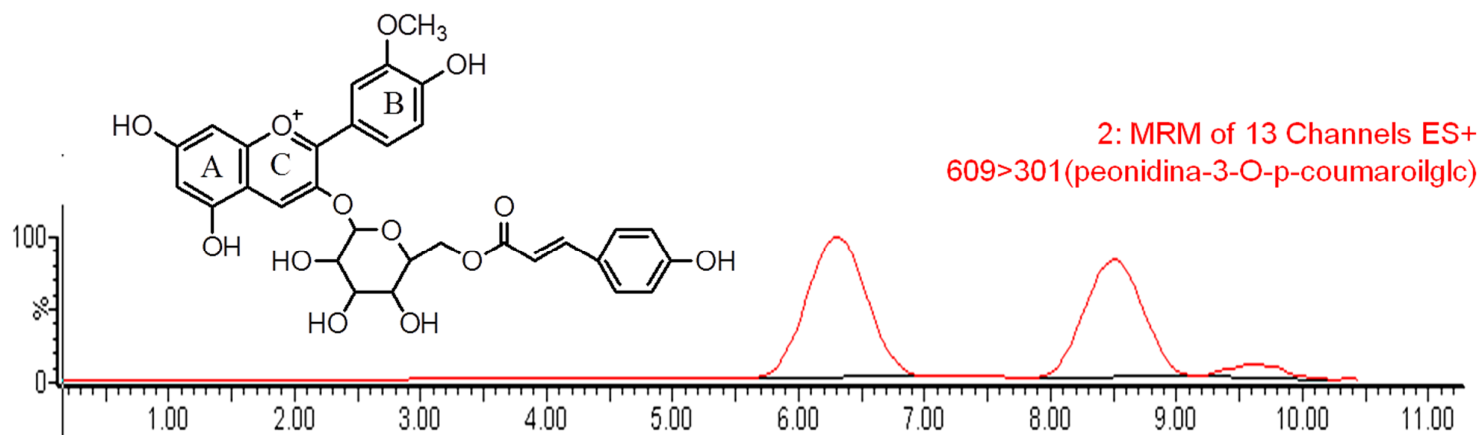
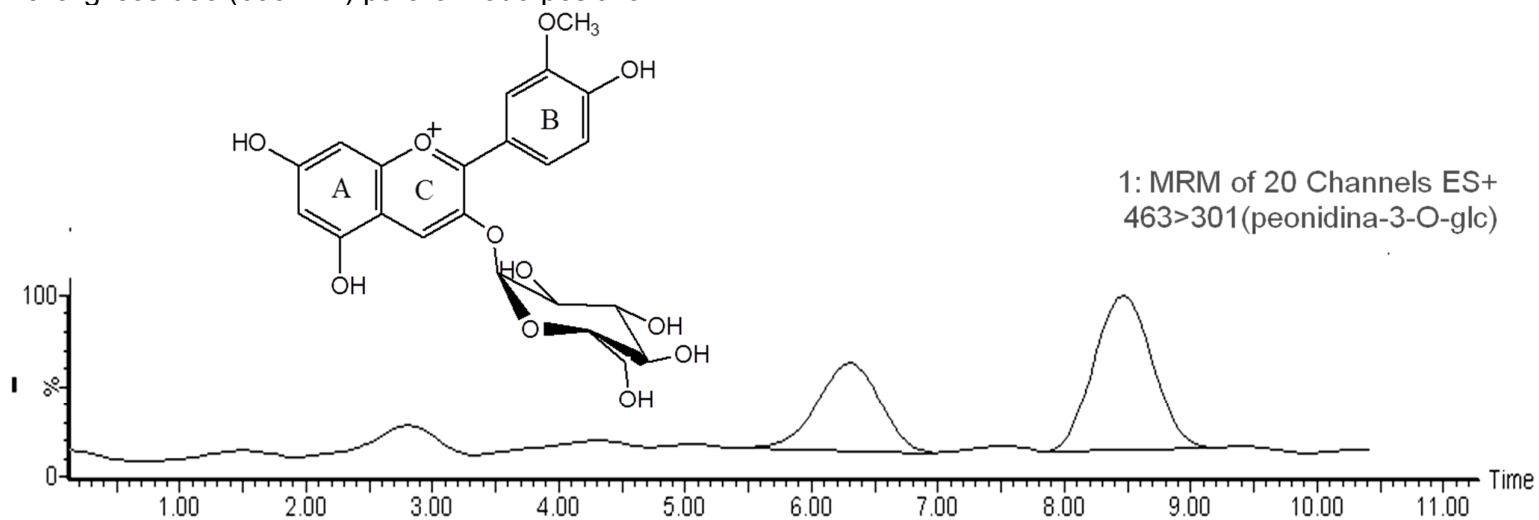
Apêndice 1 - MRM do extrato hidroetanólico (1:1, v/v) bruto da casca da *Vitis labrusca* para malvidina-3-o-glicosídeo (493 *m/z*), malvidina-3-o-p-coumaroilglicosídeo (639 *m/z*) e malvidina-3,7-o-diglicosídeo (655 *m/z*) no modo positivo.



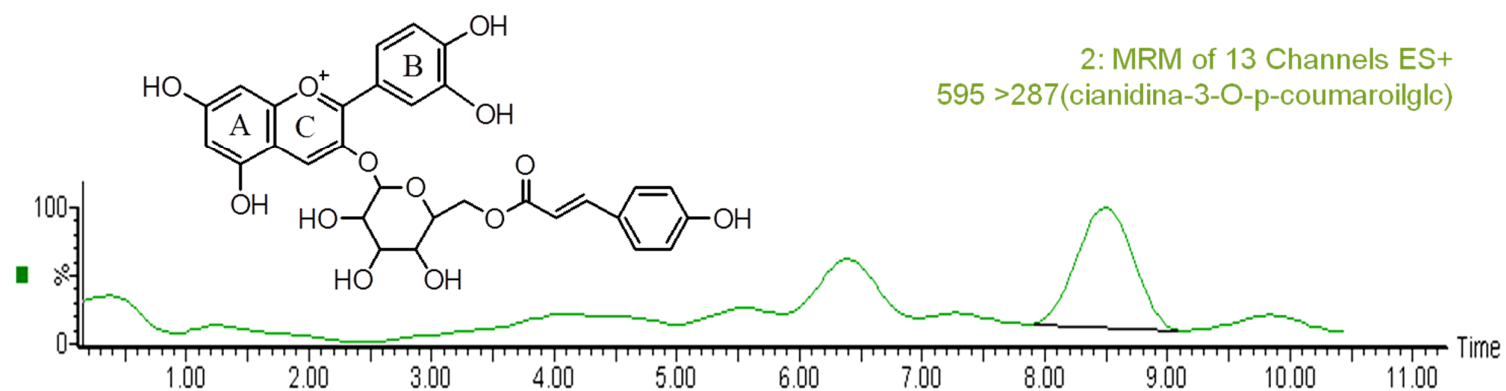
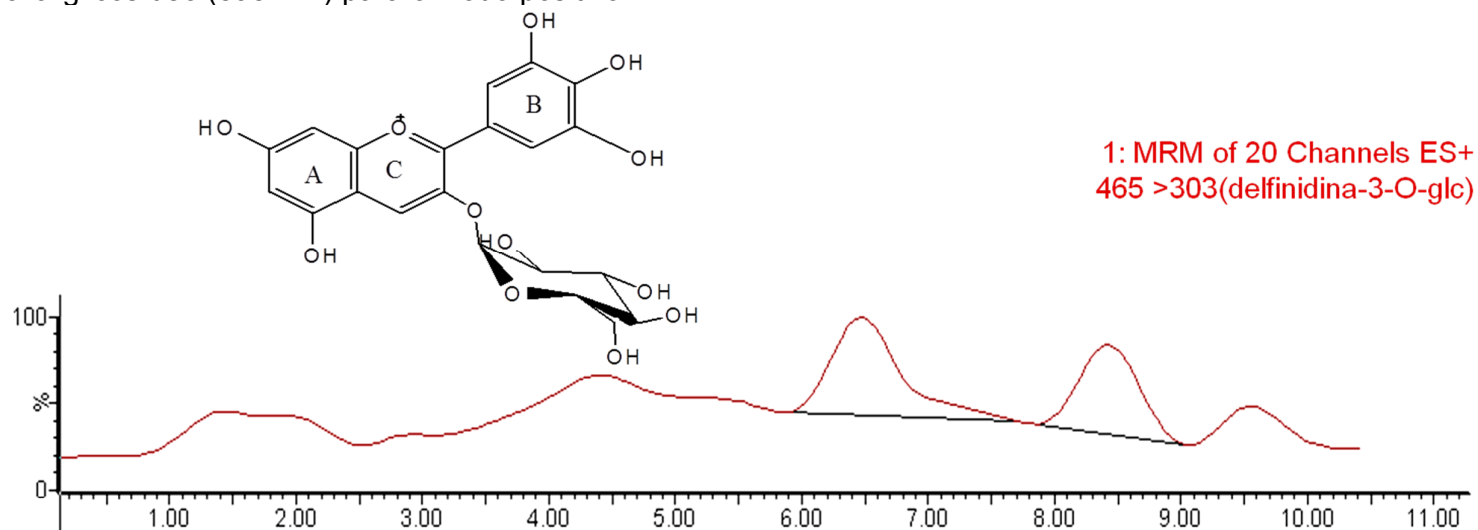
Apêndice 2- MRM do extrato hidroetanólico (1:1, v/v) bruto da casca da *Vitis labrusca* para petunidina-3-o-glicosídeo (479 m/z) e petunidina-3-o-p-coumaroilglicosídeo (625 m/z) para o modo positivo.



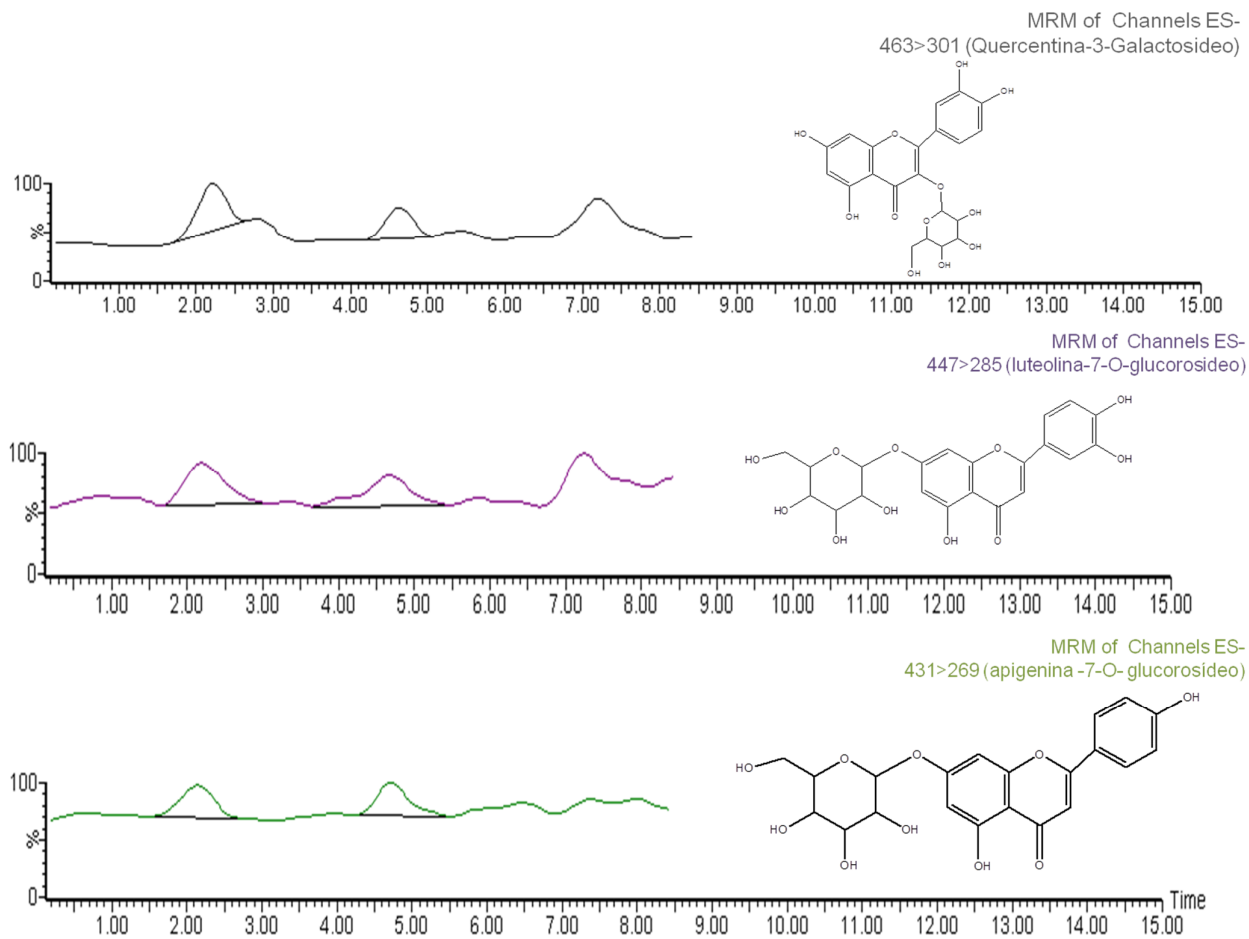
Apêndice 3- MRM do extrato hidroetanólico (1:1, v/v) bruto da casca da *Vitis labrusca* para peonidina-3-o-glicosídeo (463 m/z) e peonidina-3-o-p-coumaroilglicosídeo (609 m/z) para o modo positivo



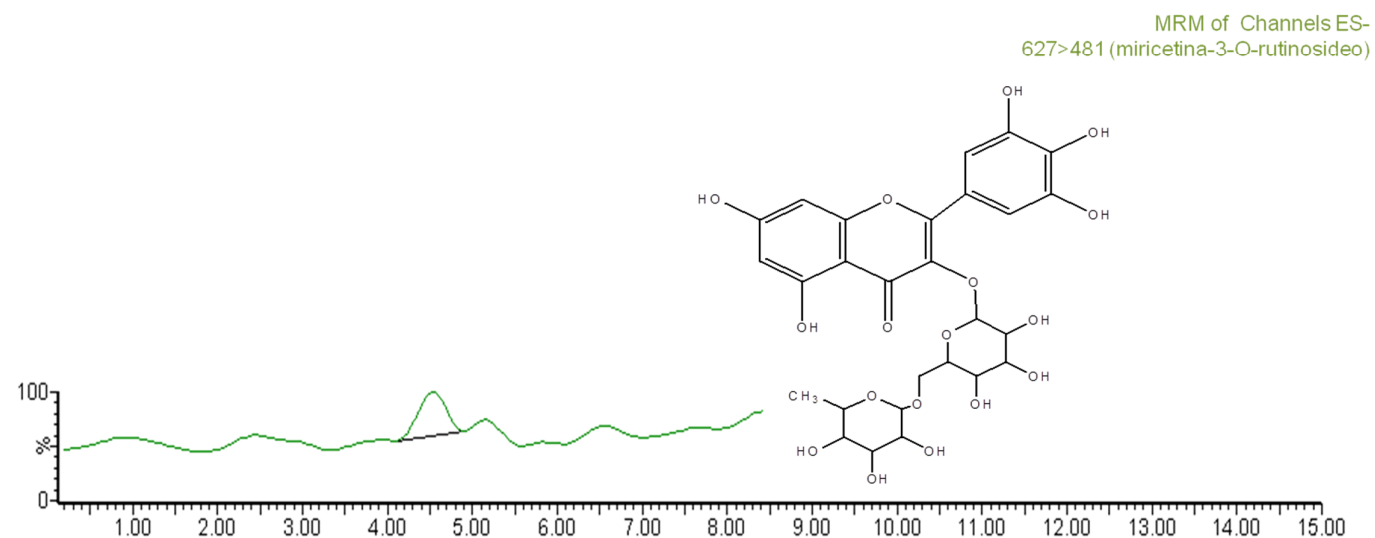
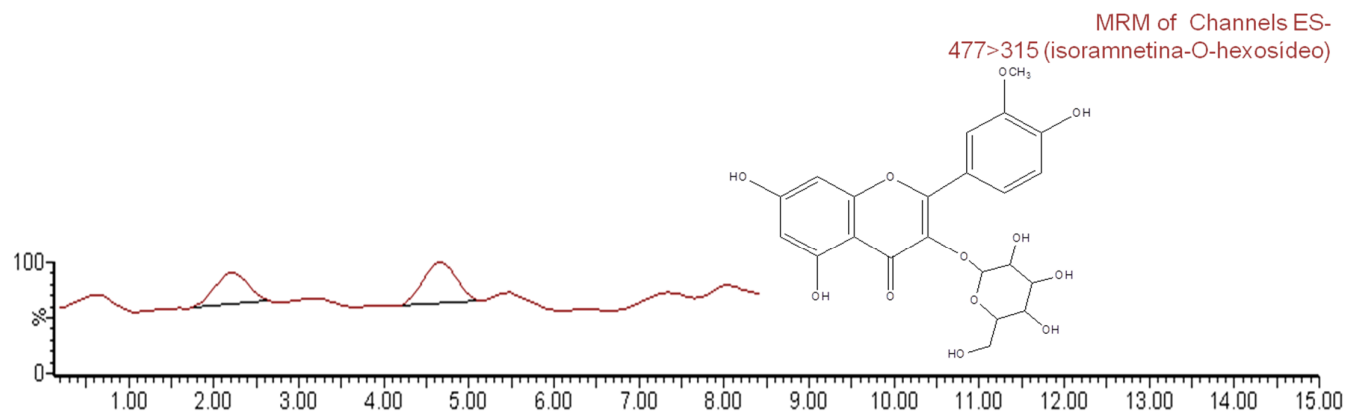
Apêndice 4- MRM do extrato hidroetanólico (1:1, v/v) bruto da casca da *Vitis labrusca* para delphinidina-3-o-glicosídeo (465 m/z) e cianidina-3-o-p-coumaroilglicosídeo (595 m/z) para o modo positivo

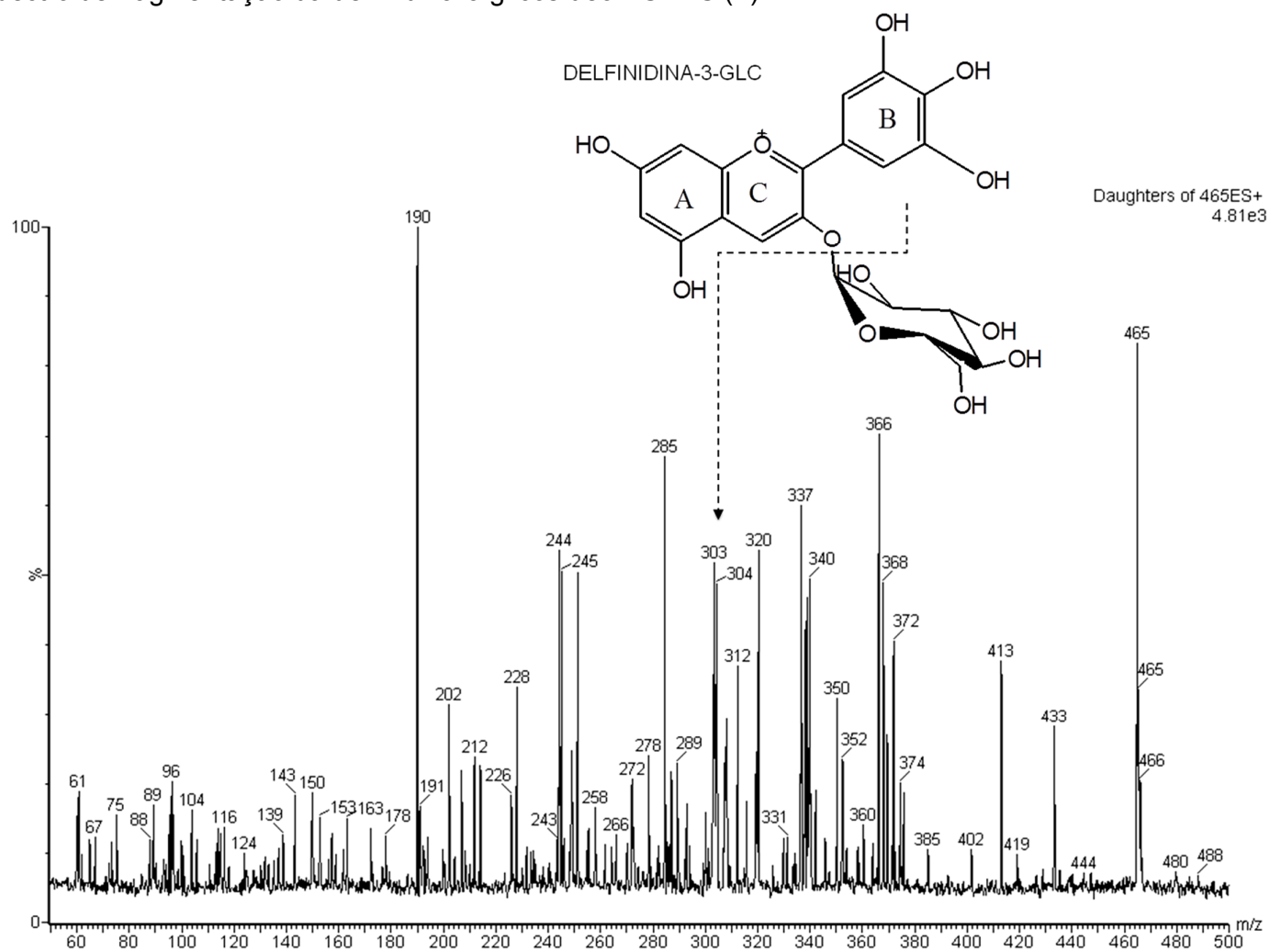


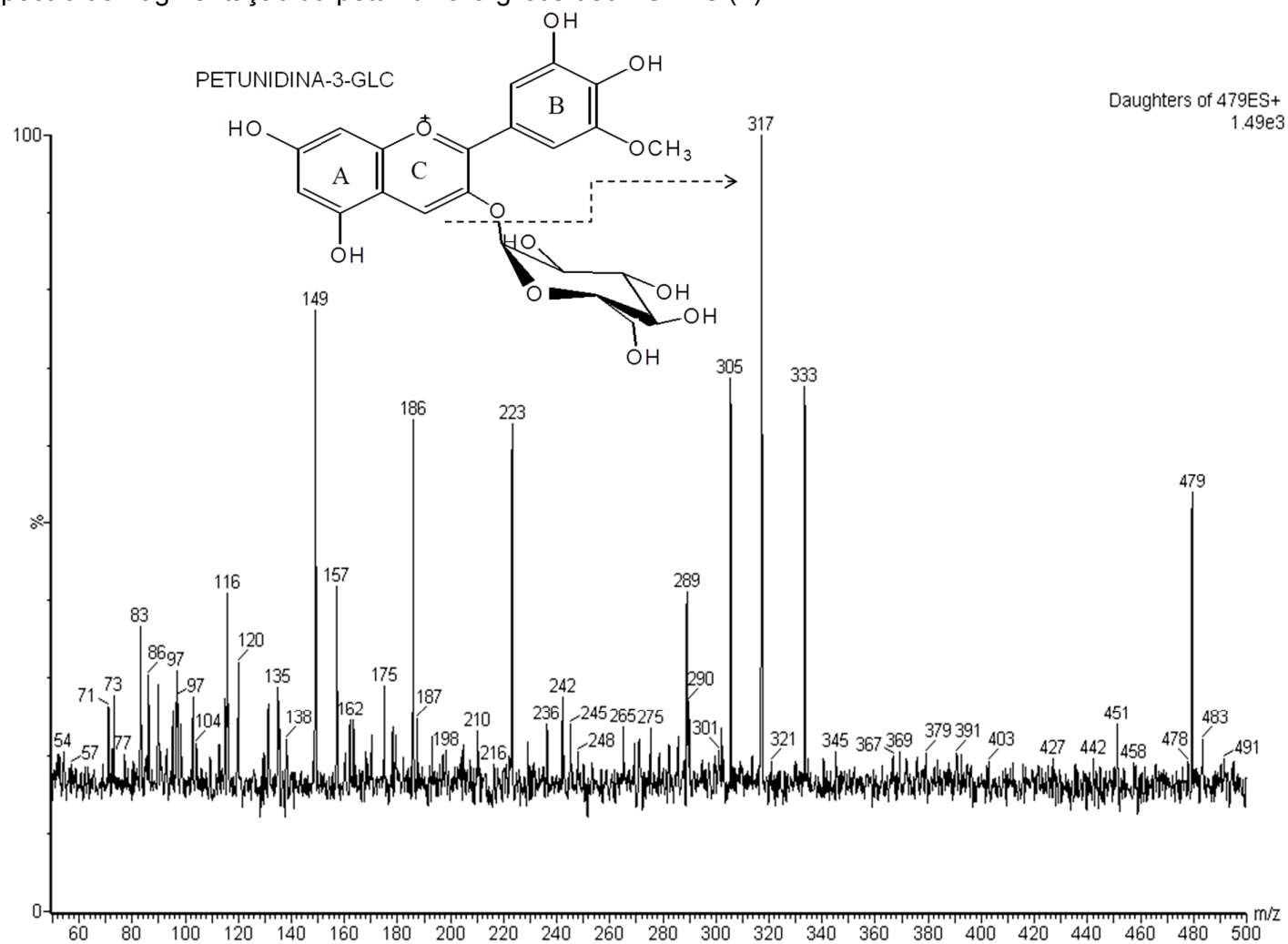
Apêndice 5- MRM do extrato hidroetanólico (1:1, v/v) bruto da casca da *Vitis labrusca* para quercentina-3-o-galactosídeo (463 *m/z*), luteolina-7-o-glucosídeo (447 *m/z*) e apigenina-7-o-glucosídeo (431 *m/z*) para o modo negativo



Apêndice 6- MRM do extrato hidroetanólico (1:1, v/v) bruto da casca da *Vitis labrusca* para isoramnetina-o-hexosídeo (477 *m/z*) e miricetina-3-o-rutinosídeo (627 *m/z*) para o modo negativo



Apêndice 7- Espectro de fragmentação da delphinidina-3-glicosídeo ESI-MS (+)

Apêndice 8-Espectro de fragmentação da petunidina-3-glicosídeo ESI-MS (+)

Apêndice 9- Espectro de fragmentação da malvidina-3-glicosídeo ESI-MS (+)