



AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE AMOSTRAS DE UVAS (*Vitis vinifera* L.)

Danielle Cristina Sampaio Pesco¹; Diego Aparecido Rosa da Silva¹; Tatiane Giacomini Damazio¹; Diógenes Aparício Garcia Cortez²; Lucia Elaine Ranieri Cortez²

RESUMO: É geralmente aceito que os radicais livres desempenham um papel importante no desenvolvimento da lesão tecidual e eventos patológicos em organismos vivos. O estresse oxidativo corresponde a um desequilíbrio entre a taxa de produção de agentes oxidantes e sua degradação. Acredita-se que as doenças degenerativas crônicas como doença de Alzheimer, doença de Parkinson, aterosclerose, complicações da Diabetes mellitus, o envelhecimento precoce estejam relacionadas com o estresse oxidativo. Vários efeitos benéficos à saúde têm sido atribuídos aos compostos presentes nas plantas, como atividade antiinflamatória, antimicrobiana, emética, oncolítica, anti-ulcera. As uvas são consideradas uma das maiores fontes de compostos fenólicos, além disso, há evidências de que os fenólicos encontrados em uvas e vinhos tintos podem inibir a oxidação *in vitro* da lipoproteína humana de baixa-densidade. Como a uva faz parte da alimentação o estudo da atividade antioxidante das mesmas é de extrema importância. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antioxidante da (*Vitis vinifera* L.). Para a preparação do extrato hidroalcoólico, utilizou-se as cascas de uvas do tipo niagara e o processo utilizado foi a maceração. A concentração do material, foi liofilizado para o ensaio da atividade antioxidante, sendo utilizado o método do DPPH. Observou-se uma capacidade antioxidante do extrato das cascas de uva mostradas numa dose dependente pelo método de DPPH com IC₅₀ de 10,23 µg/mL. Conclui-se que o extrato hidroalcoólico obtido a partir das cascas da uva apresentou atividade antioxidante, justificando a importância das cascas das uvas na alimentação, já que poderiam ser úteis na prevenção de doenças.

PALAVRAS-CHAVE: Atividade antioxidante; Plantas medicinais; Uvas.

1 INTRODUÇÃO

O estresse oxidativo corresponde a um desequilíbrio entre a taxa de produção de agentes oxidantes e sua degradação. Ocorre quando a produção de radicais livres está acelerada ou quando os mecanismos envolvidos na proteção encontram-se deteriorados (GIASSON *et al.*, 2002).

Predisposição genética, fatores ambientais como radiação UV e propriedades intrínsecas específicas de grupos celulares, podem exacerbar o dano oxidativo ou diminuir a capacidade das células de degradar estes agentes agressores (GIASSON *et al.*, 2002).

¹ Acadêmicos do Curso de Farmácia do Centro Universitário de Maringá, Maringá – Paraná. Programa de Bolsas de Iniciação Científica do Cesumar (PROBIC). pescomineli@hotmail.com, drdiegorosa@gmail.com, tatygiacomini@hotmail.com

² Orientadores, professores Doutores, Docentes do Programa de Mestrado em Promoção da Saúde do centro Universitário de Maringá – Cesumar. luciaelaine@cesumar.br, dagcortez@uem.br



É geralmente aceito que os radicais livres desempenham um papel importante no desenvolvimento da lesão tecidual e eventos patológicos em organismos vivos (RIVELLI *et al.*, 2007) Acredita-se que as doenças degenerativas crônicas como doença de Alzheimer, doença de Parkinson, aterosclerose, complicações da *Diabetes mellitus*, o envelhecimento precoce e outras estejam relacionadas com o estresse oxidativo (SORG, 2004).

O envelhecimento humano é um fenômeno complexo e muitas teorias foram sugeridas para explicar esse processo como a teoria baseada no estresse oxidativo, um desequilíbrio causado quando as defesas antioxidantes estão quantitativa ou qualitativamente impossibilitadas de neutralizar a produção e os efeitos de moléculas oxidantes, ocasionando danos em biomoléculas como lipídios, proteínas e DNA, que vão se acumulando ao longo dos anos, produzindo danos celulares e teciduais, resultando no envelhecimento do organismo (PANZIERA *et al.*, 2011).

A utilização popular das plantas medicinais no Brasil, com fins terapêuticos e rituais religiosos, provém de diferentes origens e culturas tradicionais, principalmente de índios brasileiros e seitas afro-brasileiras, e da cultura e tradição africana e europeia (BERG, 1993; CARRARA, 1995; SIMÕES *et al.*, 1998).

Estes mesmos autores ainda indicam que o uso e o comércio destes recursos, como em outros países, foram estimulados pelas necessidades de uma crescente população que demanda cada vez mais plantas medicinais para o cuidado de sua saúde e para seus cultos e tradições religiosas; pela facilidade de acesso devido aos custos elevados da medicina ocidental, aos efeitos colaterais provocados pelos fármacos sintéticos, além do crescente interesse nacional e internacional pelo potencial terapêutico e econômico que representam e a demanda de novos produtos pela indústria farmacêutica.

As plantas medicinais são frequentemente apresentadas como um grande potencial para a origem de novos fármacos, sendo uma fonte de novas substâncias bioativas (FAUSTINO *et al.*, 2010). Ultimamente há um aumento no interesse em antioxidantes naturalmente encontrados em plantas, a fim de substituí-los pelos antioxidantes sintéticos, os quais têm uso restrito devido a seus efeitos colaterais, tais como carcinogenicidade (ITO *et al.*, 1983).



Além disso, os antioxidantes naturais possuem a capacidade de melhorar a qualidade e a estabilidade dos alimentos, agirem como nutracêuticos e proporcionar, ainda, benefícios adicionais à saúde dos consumidores (LAI; CHOU; CHAO, 2001).

Vários efeitos benéficos à saúde têm sido atribuídos aos compostos presentes nas plantas e estudos demonstram que dentre estas atividades destaca-se a atividade antioxidante, (STALIKAS, 2007). Os antioxidantes presentes nas plantas podem atuar como agentes redutores, sequestradores de radicais livres, inibidores de enzimas e como quelantes de metais (WANG; LIN, 2000).

As uvas (*Vitis vinífera* L.) é uma planta trepadeira com gavinhas de porte arbustivo suas folhas são alternas pecioladas, cordiformes, com cinco lóbulos sinuados dentados, glabras na parte superior e tomentosas na parte inferior. As flores são pequenas e de cor branco esverdeada, dispostas em racimos. (SCHLEIER, 2004).

O cacho de uva é composto por uma parte lenhosa – o engajo – e de uma parte carnuda – os bagos. Estes são formados por uma pele de espessura variável – a película ou casca – e, na parte interna, pela polpa e pelas sementes, ou inexistentes ou até quatro, dependendo da variedade. Conforme as variedades, ou castas, ou bagos variam de formato cor e consistência (AMARANTE, 2005).

As uvas são consideradas uma das maiores fontes de compostos fenólicos quando comparadas a outras frutas e vegetais (MAXCHEIX; FLEURIET; BILLOT, 1990), além disso, há evidências de que os fenólicos encontrados em uvas e vinhos tintos podem inibir a oxidação *in vitro* da lipoproteína humana de baixa-densidade (LDL) (FRANKEL; WATERHOUSE; TEISSEDE, 1995), assim como é possível seu uso na prevenção de aterosclerose (KOVAC; PEKIC, 1991).

As sementes e casca de uva contêm flavonoides (catequina, epicatequina, procianidinas e antocianinas), ácidos fenólicos e resveratrol, que mostraram ter atividades funcionais. O extrato de procianidinas da semente da uva apresentou atividade antioxidante *in vivo* (SATO et. al., 2001) e poderia ser tão importante quanto à vitamina E em impedir os danos oxidativos nos tecidos (TEBIB et.al., 1997), reduzindo a oxidação lipídica (Bouhamidi et. al., 1998), e/ou inibir a produção de radicais livres (BAGCHI et al., 1998). Como a uva faz parte da alimentação e apresenta em sua composição uma riqueza de compostos fenólicos, o estudo da atividade antioxidante da mesma é de extrema importância.



2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL VEGETAL

Foram utilizadas cascas de uvas do tipo Niágara obtidas em supermercados na cidade de Maringá, Paraná.

2.2 PROCESSAMENTO DO MATERIAL VEGETAL

Separaram-se as sementes das cascas e estas amostras foram submetidas à secagem em estufa de ar circulante e posteriormente moídas em moinho de facas. As amostras foram então acondicionadas em local seco e ao abrigo da luz.

Determinou-se então a quantidade das cascas das uvas após moagem e estas foram extraídas na proporção 1:10 (m/v) com solução hidroetanólica 90% (1:9, v/v), pelo processo de maceração. A extração foi realizada em frasco âmbar mantido à temperatura ambiente, com agitação ocasional. O extrato foi filtrado diariamente, com renovação do líquido extrator.

Após esgotamento do material, o filtrado obtido foi concentrado sob pressão reduzida em evaporador rotatório, à temperatura de 40°C. Após a eliminação do solvente, o extrato foi congelado em nitrogênio líquido e liofilizado. O extrato liofilizado foi armazenado em frasco plástico hermeticamente fechado e mantido sob temperatura de congelamento, obtendo-se o extrato hidroalcóolico das cascas da uva (EHA).

2.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO DPPH

A atividade antioxidante foi avaliada pelo ensaio DPPH• baseada na metodologia de BLOIS (1958) e BRAND-WILLIAMS et. al. (1995), que tem por base a redução do radical estável DPPH pelos antioxidantes com mudança de coloração violeta para amarela, proporcional à concentração da substância redutora da amostra, observando



desta forma uma diminuição da absorvância o que permite calcular após o estabelecimento do equilíbrio da reação a quantidade de antioxidante necessária para reduzir 50% do radical DPPH•.

Para isso, foram testadas várias concentrações do extrato para avaliar a faixa linear em que cada um apresentava a atividade antioxidante no método avaliado. As amostras foram preparadas conforme descritas abaixo:

Foram pesados 10 mg do extrato, solubilizados em metanol com auxílio do ultrassom e o volume foi completado para 10 mL em Balão volumétrico obtendo-se assim solução estoque de 1 mg/mL do extrato EHA.

Para a avaliação da atividade antioxidante por esse método, em uma fração de 3 mL de cada solução foi adicionado 320µL de DPPH a 0,87 mM, concentração necessária para a leitura da absorvância ser entre 0,9 e 1. As amostras então permaneceram ao abrigo da luz por 30 minutos.

A leitura foi realizada em espectrofotômetro UV (Thermocientific Evolution 60) a 517 nm. Como controle positivo foi utilizado butilhidroxitolueno (BHT), como controle negativo foi utilizado 3 mL de metanol e 320 µL de DPPH e como branco foi utilizado a própria amostra em cada concentração analisada sem adição de DPPH

A atividade sequestrante de radicais (%ASR) em porcentagem foi calculada através da fórmula:

$$\%ASR = \frac{(\text{Abs. controle negativo} - \text{Abs. Amostra}) \times 100}{\text{Abs. controle negativo}}$$

Abs. controle negativo

Com os valores obtidos foi construído um gráfico de %ASR versus concentração em µg/mL. Para o cálculo do IC50 foi utilizada a equação da reta, substituindo o valor de y por 50 para obtenção da concentração da amostra com capacidade de reduzir 50% do DPPH.



3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo foi usado o método fotocolorimétrico do DPPH para a análise do extrato das cascas de uva, este método tem sido muito utilizado para avaliar a atividade antioxidante (HIDALGO et al., 2010) de substâncias químicas, como as presentes nas cascas de uvas. Este método se baseia na redução do radical livre estável DPPH.

Neste experimento foi observada uma capacidade antioxidante do extrato das cascas de uva mostradas numa dose dependente pelo método de DPPH e o IC₅₀ foi de 10,23 µg/mL. SOUZA et al, 2012 relata também a alta atividade antioxidante de uvas do tipo niagara.

ABE et al, 2007, obteve um resultado satisfatório da atividade antioxidante (7,6 ± 0,4 µg/mL) de amostras de uvas do tipo Niágara rosada IAC 766. O mecanismo da reação entre os antioxidantes nas cascas de uva e o reagente DPPH, depende do número de grupos hidroxilas presentes nos polifenóis e antocianinas presentes nestas cascas. (BONDET, et al., 1997).

Quanto mais intensa a coloração da uva, mais interessante se torna do ponto de vista funcional, já que as uvas de coloração escura apresentaram maior conteúdo de compostos fenólicos e capacidade antioxidante (ABE et al, 2007).

4 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi realizado o estudo da atividade antioxidante do extrato obtidos a partir do resíduo da fermentação da uva através do método de DPPH para determinação da atividade antioxidante *in vitro*.

Com os resultados obtidos através desta metodologia de atividade antioxidante, conclui-se que o extrato hidroalcoólico obtido a partir das cascas da uva apresentou uma boa atividade antioxidante, justificando a importância das cascas das uvas na alimentação, já que poderiam ser úteis na prevenção de doenças.



REFERÊNCIAS

ABE, L. T.; DA MOTA, R. V.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I.. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. **Ciênc. Technol. Aliment.**, Campinas, v.27, n.2, p. 394-400, abr.-jun. 2007

AMARANTE, J. O. A. . **Os segredos do vinho para iniciantes e iniciados**. 2. ed. São Paulo: Mescla, 2005.

BAGCHI, D.; GARG, A.; KROHN, R.L.; BAGCHI, M.; BAGCHI D.J.; BALMOORI, J.; STOHS, S.J., Protective effects of grape seed proanthocyanidins and selected antioxidants against TPA-induced hepatic and brain lipid peroxidation and DNA fragmentation, and peritoneal macrophage activation in mice, **General Pharmacology**, Tarrytown, v. 30, n.5, p.771–776, 1998.

BERG, M. E. D. Plantas medicinais na Amazônia: contribuição ao seu conhecimento sistemático. 2 ed. **Rev. E aum-** Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, 1993.

BONDET, W.; WILLIAMS, W.B.; BERSET, C. kinetic and mechanism of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *Lebensmittel-Wissenschaft Un Technologie*.v.30,p.609-915, 1997.

BOUHAMIDI, R.; PRÉVOST, V.; NOUVELOT, A. High protection by grape seed proanthocyanidins (GSPC) of polyunsaturated fatty acids against UV-C induced peroxidation. *Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série III, Sciences de la vie*, Montrouge, v. 321, p. 31-38, 1998.

DEFILIPPS. R. Conservation of Brazilian Medicinal Plants. **Biological Conservation Newsletter**. n.193, 2001.

FAUSTINO, T.; ALMEIDAR, B.; ANDREATI, R. Plantas medicinais no tratamento do transtorno de ansiedade generalizada: uma revisão dos estudos clínicos controlados. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v.32, n.4, p.429-436, 2010.

FRANKEL, E.N.; WATERHOUSE. A.L.; TEISSEDRE, P.L.1995. Principle phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoprotein. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Columbus, v. 43, n.4, p. 890–894.



GIASSON, B.I.; ISCHIROPOULOS H.; LEE.V. M. Y.; TROJANOWSKI, J. Q. The relationship between oxidative/nitrative stress and pathological inclusions in Alzheimer's and Parkinson's diseases. **Free Radical Bio Med.** V.32, p.1264-1275, 2002.

HIDALGO, M.; SÁNCHEZ MORENO, C; De Pascual -Tereza, S.Flavonoid-flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity. **Food chemistry.**v.121, p.691-696, 2010.

ITO, N.; FUKUSHIMA, S.; HASEGAWA, A.; SHIBATA, M; OGISO, T. Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole in F344 rats. **Journal of the National Cancer Institute**, Cary, v. 70, n.2, p. 343–347, 1983.

KOVAC, V.; PEKIC, B. Proanthocyanidols from grape and wine. **Contemporary Agriculture.** v. 39, n. 4, p. 5-17, 1991.

LAI, L. S.; CHOU, T.; CHAO, W. W. Studies on the antioxidative activities of Hsian-tsao (*Mesona procumbens* Hemsl) leaf gum. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v.49, n.2, p. 963–968, 2001.

MAXCHEIX, J. J.; FLEURIET, A.; BILLOT, J. **The main phenolics of fruits.** CRC Press: Boca Raton, FL, p. 1-98, 1990.

NERI. A.L., DEBERT.,G.G. **Velhice e sociedade.** Campinas: Papirus,1999.

PANZIERA, F. B.; DORNELES, M. M.; DURGANTE, P. C.; SILVA V. L. DA SILVA. Avaliação da ingestão de minerais antioxidantes em idosos. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, Rio de Janeiro.v. 14, n.1, p. 49-58, 2011.

RIVELLI, D. P.; SILVA V. V.; ROPKE C. D.; MIRANDA, D. V.; ALMEIDA, R.L.; SAWADA, T. C. H.; BARROS, S. B. M. Simultaneous determination of chlorogenic acid, caffeic acid and caffeine in hydroalcoholic and aqueous extracts of *Ilex paraguariensis* by HPLC and correlation with antioxidant capacity of the extracts by DPPH· reduction. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v.43, n.2, p. 215-222, 2007.

SATO, M.; BAGCHI D.; TOSAKI, A.; DAS, D.K., Grape seed proanthocyanidin reduces cardiomyocyte apoptosis by inhibiting ischemia/reperfusion-induced activation of JNK-1 and C-JUN. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v.31, n.6, p.729–737, 2001.

SCHLEIER, RODOLFO. **Constituintes fitoquímicos de *Vitis vinifera* L. (uva).** Monografia apresentada para obtenção do título de Especialista em Fitoterapia no IBEHE / FACIS. São Paulo: IBEHE, 2004.



SORG, O. Oxidative stress: a theoretical model or biological reality? **Comptes Rendus Biologies**. v. 327, p. 649-662, 2004.

SOUZA, A.V.; GOMES, G.P.; VIEIRA, M.R.S.; VIEITES, R.L.; LIMA, G.P.P. Atividade antioxidante em polpa de Vitis sp. **Revista Alimentus**, Marília, v. 2, n.2, p.10-19, 2012.

STALIKAS C. D, Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal of Separation Science**.v. 30, p.3268 – 3295, 2007.

TEBIB, K.; ROUANET, J.M.; BESANCON, P. Antioxidant effects of dietary polymeric grape seed tannins in tissues of rats fed a high cholesterol-vitamin E-deficient diet. **Food Chemistry, Kidlington**, v.59, n.1, p.135–141, 1997.

WANG, S. Y.; LIN, H., S. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v. 48, n.2, p.140-146, 2000.