

Avaliação da atividade antioxidante de bagaço de uva em tecido animal *in vitro*

RESUMO

Cleidiane da Silva

cleidi_dsv@hotmail.com

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, UTFPR, Pato Branco, PR, Brasil

Tatiane Luiza Cadorin Oldoni

tatieneoldoni@utfpr.edu.br

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, UTFPR, Pato Branco, PR, Brasil

Gustavo Roberto Thomé...

gurotho@gmail.com

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, UTFPR, Pato Branco, PR, Brasil

Anaclara Prasniewski

anaclaraprasniewski@hotmail.com

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, UTFPR, Pato Branco, PR, Brasil

Thariane Bicas

thari.cb@gmail.com

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, UTFPR, Pato Branco, PR, Brasil

OBJETIVO: desenvolver um método novo de oxidação, que simule com maior proximidade o ambiente fisiológico utilizando ensaio *in vitro* para simular a atividade antioxidante de compostos de interesse em tecido biológico de camundongo com um agente oxidante – complexo Fe-glutamato – de fácil obtenção, baixo custo e eficiente em pH fisiológico. **MÉTODOS:** O extrato e as frações do bagaço de uva foram avaliados quanto à sua capacidade antioxidante por meio dos ensaios de Compostos Fenólicos Totais, sequestro dos radicais DPPH e ABTS, redução do ferro e capacidade de inibir a peroxidação lipídica em tecido animal *in vitro* com o ensaio de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS). **RESULTADOS:** O complexo Fe-glutamato se mostrou como um eficiente agente oxidante em meio biológico, oxidando o tecido ainda em pH fisiológico. As amostras testadas como agentes antioxidantes – extrato e frações do bagaço de uva – apresentaram maior inibição da peroxidação lipídica com o aumento da concentração, demonstrando que os compostos antioxidantes de fato controlam a ação do oxidante. **CONCLUSÕES:** Os resultados obtidos para determinação da atividade antioxidante destes compostos puderam ser relacionados com a análise de TBARS, demonstrando que quanto maior a capacidade antioxidante, menor o índice de peroxidação lipídica em tecido animal na presença de um agente oxidante.

PALAVRAS-CHAVE: Atividade antioxidante. Tecido animal. Agente oxidante.

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a preocupação com a boa alimentação e qualidade de vida vem aumentando e, em função disso, atenção especial tem sido dada a alimentos naturais que apresentam compostos com capacidade antioxidante, como os compostos fenólicos, capazes de inibir os radicais livres que, se presentes em excesso, causam danos à saúde (SANG et al., 2009).

A uva, seus derivados e coprodutos são fonte de compostos bioativos com elevada atividade antioxidante, podendo ser empregados como fontes naturais de compostos fenólicos e antioxidantes (RANA et al., 2015). Uma alternativa para se obter compostos puros e biologicamente ativos em relação à atividade antioxidante de extratos naturais é desenvolver o estudo de purificação e isolamento bioguiado (KARLING, 2017), o que permite potencializar a ação dos antioxidantes e antimicrobianos nas suas aplicações. Diversas técnicas são utilizadas para analisar qualitativa e quantitativamente esses compostos de interesse, prevalecendo a escolha de ensaios *in vitro* com reagente sintéticos, tais como: teor de compostos fenólicos totais (CFT), captura dos radicais 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH•) e 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS•+) e redução do ferro (FRAP).

Com o objetivo de desenvolver um método novo que simule com maior proximidade o ambiente fisiológico, este estudo sugere a utilização de teste *in vitro* em tecido biológico de camundongo com um agente oxidante de fácil obtenção, baixo custo e eficiente em pH fisiológico, sendo potencial substituto para os padrões oxidantes sintéticos comumente utilizados neste tipo de ensaio (MARQUES, 2014; SHODEHINDE, OBOH, 2013), os quais apresentam elevados valores para compra, conferindo à análise um custo mais elevado.

Nesse contexto, o extrato e as frações do bagaço de uva foram avaliados quanto à sua capacidade antioxidante por meio dos ensaios de CFT, seqüestro dos radicais DPPH e ABTS, redução do ferro e capacidade de inibir a peroxidação lipídica em tecido animal *in vitro*.

2 MÉTODOS

2.1 AMOSTRAS

As amostras do coproduto Bagaço de Uva (BU) provenientes da produção de vinho tinto foram coletadas em uma vinícola localizada na cidade de Mariópolis, sudoeste do Paraná. As frações Hexânica (F-HEX), Diclorometano (F-CH₂Cl₂), Acetato de Etila (F-ACET) e Hidroalcoólica (F-EtOH) foram obtidas a partir do fracionamento líquido-líquido do extrato bruto (EEBU) liofilizado do BU (KARLING, 2017). Diferentes concentrações de cada fração e do extrato bruto foram solubilizadas no solvente polar dimetilsulfóxido (DMSO), o qual é amplamente utilizado na indústria farmacêutica por penetrar facilmente a membrana biológica sem agredir suas células.

2.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O extrato e as frações do BU foram submetidos às análises de CFT (SINGLETON, ORTHOFER, LAMUELA, 1999) e sequestro dos radicais DPPH (BRAND-WILLIAMS, CUVELIER, BERSET, 1995) e ABTS (RE et al., 1999), além da capacidade de redução do ferro (BENZIE, STRAIN, 1996), determinando a capacidade de estabilizar os radicais livres a partir da quantificação da sua atividade antioxidante.

2.3 ATIVIDADE BIOLÓGICA

O extrato bruto e as frações do BU foram submetidos ao ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, do inglês: thiobarbituric acid reactive substances), realizado com tecido de fígados de camundongos sadios (protocolo de registro no CEUA: 001/17 – Faculdade de Pato Branco, FADEP). A análise de TBARS (OHKAWA, OHISHI, YAGI, 1979) com modificações permite dosar o índice de peroxidação lipídica no tecido *in vitro*. Este método baseia-se na reação de duas moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA) com uma de malondialdeído (MDA), produzindo um complexo de coloração rosa, quantificado pela leitura em espectrofotômetro a 532nm.

2.4 INDUÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO

Com o intuito de gerar a reação oxidativa de maneira a conferir menor custo à análise, aplicou-se o princípio da Reação de Fenton, que consiste na liberação de radicais OH• em presença de peróxido de hidrogênio.

Um complexo estável com sal de ferro e ácido glutâmico foi gerado a partir da reação entre 2 g de carbonato de cálcio, 6 g de ácido glutâmico e 3 g de sulfato de ferro em constante agitação e incubação por 30 min sob abrigo da luz a temperatura ambiente. Após incubação e centrifugação, o sobrenadante foi coletado e liofilizado, obtendo-se aproximadamente 6 g do complexo Fe-glutamato (ELSHAFEI et al., 2010). Este agente indutor de estresse foi escolhido por liberar radicais hidroxil de maneira mais eficiente em pH fisiológico, favorecendo seu uso em tecido animal.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das análises antioxidantes (AA) *in vitro* para o extrato e as frações do bagaço de uva estão apresentados na Tabela 1. A F-HEX não apresenta resultado para os ensaios de CFT e FRAP em função da insolubilidade no meio reacional. Tanto para o teor de CFT quanto para as análises antioxidantes, as frações F-ACET e F-CH₂Cl₂ apresentaram melhores resultados, enquanto para FRAP, a fração F-EtOH se mostrou mais eficiente.

Tabela 1 – Teor de CFT e atividade antioxidante pelos métodos DPPH, ABTS e FRAP do extrato e frações do bagaço de uva

AMOSTRA	CFT ¹	DPPH ²	ABTS ²	FRAP ³
EEBU	152,9 ± 2,54	714,7 ± 25,1	959,7 ± 29,4	2627 ± 54,1
F-HEX	-	19,34 ± 3,52	46,98 ± 0,00	-

F-CH ₂ Cl ₂	118,2 ± 2,00	445,9 ± 14,5	627,1 ± 0,00	1713 ± 66,7
F-ACET	380,2 ± 5,82	2101 ± 47,9	2163 ± 52,5	7421 ± 213
F-EtOH	93,10 ± 3,22	452,1 ± 3,79	544,2 ± 45,5	8261 ± 368

Resultado expresso como média ± desvio padrão. EAG = equivalente ao ácido gálico. ¹mg EAG g⁻¹ de extrato ou fração; ²μmol trolox g⁻¹ de extrato ou fração; ³μmol Fe²⁺ g⁻¹ de extrato ou fração.

Fonte: Karling, 2017.

A avaliação da capacidade antioxidante das amostras de bagaço de uva foi realizada com a adição de agente oxidante 37,5 mmol L⁻¹ na reação de TBARS. A reação de liberação do radical hidroxil foi iniciada com adição de peróxido de hidrogênio 65 mmol L⁻¹. As frações F-CH₂Cl₂ e F-ACET, que obtiveram os melhores resultados para os ensaios de CFT e AA, também foram as que apresentaram melhor capacidade de inibir a peroxidação lipídica nos tecidos, resultando em menores valores de malondialdeído gerado por g de tecido. As demais frações e o extrato bruto também apresentaram resultados significativos, mostrados na Tabela 2.

Tabela 2 – Resultados dos ensaios de TBARS para o extrato e as frações do BU

Amostra / Concentração	TBARS (nmol MDA g ⁻¹ tecido)		
	100 (mg L ⁻¹)	375 (mg L ⁻¹)	940 (mg L ⁻¹)
EEBU	16,5	16,2	6,50
F-HEX	15,5	11,6	13,0
F-CH ₂ Cl ₂	4,70	3,30	2,70
F-ACET	10,1	4,90	2,60
F-EtOH	22,4	16,3	8,00

Fonte: autoria própria.

O controle de tecido + agente oxidante (37,5 mmol L⁻¹) apresentou um resultado de 21,4 nmol MDA g⁻¹ de tecido. De maneira geral, a eficiência de inibição da peroxidação lipídica aumenta de acordo com o aumento da concentração do agente antioxidante.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que o coproduto bagaço de uva contém compostos que podem ser utilizados como fonte de antioxidantes naturais pela indústria farmacêutica e de alimentos. Os valores de CFT e AA apresentados podem ser associados à eficiente ação de inibição da peroxidação lipídica destes compostos em tecido animal. Por fim, a utilização do complexo Fe-glutamato como agente oxidante se mostrou apropriado para uso em meio fisiológico de tecido animal, podendo vir a substituir os oxidantes padrões largamente utilizados até o momento.

Evaluation of the antioxidant activity of grape marc in animal tissue in vitro

ABSTRACT

OBJECTIVE: to develop a new oxidation method that simulates the physiological environment with greater proximity to the antioxidant activity of compounds of interest in mouse biological tissue with an oxidizing agent - Fe-glutamate complex - easy to obtain, low cost and efficient in physiological pH. **METHODS:** Grape marc extract and fractions were evaluated for their antioxidant capacity by means of the Total Phenolic Compounds assays, sequestration of the DPPH and ABTS radicals, iron reduction and the ability to inhibit lipid peroxidation in animal tissue in vitro with the Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) assay. **RESULTS:** The Fe-glutamate complex was shown to be an efficient oxidizing agent in biological medium, oxidizing the tissue still at physiological pH. Samples tested as antioxidants - extract and grape marc fractions - showed greater inhibition of lipid peroxidation with increasing concentration, demonstrating that antioxidant compounds do indeed control the action of the oxidant. **CONCLUSIONS:** The results obtained to determine the antioxidant activity of these compounds could be related to the analysis of TBARS, demonstrating that the higher the antioxidant capacity, the lower lipid peroxidation index in animal tissue in the presence of a strong oxidizing agent.

KEYWORDS: Antioxidant activity. Animal tissue. Oxidizing agent.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Programa de Bolsas de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação – PIBITI da Universidade Tecnológica Federal do Paraná pelo fomento para esta pesquisa e à Central de Análises pelo espaço cedido .

REFERÊNCIAS

- BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 1996.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 1995.
- ELSHAFEI, G. M. S.; YEHA, F. Z.; DIMITRY, O. I. H.; BADAWI, A.M.; ESHAQ, G. Degradation of nitrobenzene at near neutral pH using Fe–glutamate complex as a homogeneous Fenton catalyst. *Applied Catalysis B: Environmental*, v. 99, p. 242–247, 2010.
- KARLING, M. Isolamento bioguiado de compostos com atividade antioxidante do coproduto bagaço de uva. Dissertação de Mestrado, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2017.
- MARQUES, N. F. Centella asiática reduz peroxidação lipídica induzida por ácido quinolínico e nitroprussiato de sódio in vitro em regiões do cérebro de rato. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.
- OHKAWA, H., OHISHI, N., YAGI, K.. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, v. 95, p. 351–358, 1979.
- RANA, S.; GUPTA, S.; RANA, A.; BHUSHAN, S. Functional properties , phenolic constituents and antioxidant potential of industrial apple pomace for utilization as active food ingredient. *Food Science and Human Wellness, Beijin*, v. 4, p. 180–187, 2015.
- 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*, 1999.
- SANG, S.; YANG, I.; BUCKLEY, B.; HO, C.-T.; YANG, C.S. Antioxidative quinone formation in vitro and metabolite and formation in vivo from tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate: studied by real-time mass spectrometry combined with tandem mass ion mapping. *Free Radical Biology and Medicine, San Diego*, v. 43, p. 362–371, 2009.
- SHODEHINDE, S. A.; OBOH, G. Antioxidant properties of aqueous extracts of unripe on sodium nitroprusside induced lipid peroxidation in rat pancreas. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v. 3, p. 449-457, 2013.
- SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods of Enzymology*, v. 299, p. 152-178, 1999.

Recebido: 31 ago. 2017.

Aprovado: 02 out. 2017.

Como citar:

SILVA, C. et. al. Avaliação da atividade antioxidante de bagaço de uva em tecido animal in vitro. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA DA UTFPR, 22., 2017, Londrina. **Anais eletrônicos...** Londrina: UTFPR, 2017. Disponível em: <<https://eventos.utfpr.edu.br/sicite/sicite2017/index>>. Acesso em: XXX.

Correspondência:

Cleidiane Silva

Via do Conhecimento, Km 1, Pato Branco, Paraná, Brasil.

Direito autoral:

Este resumo expandido está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição-Não Comercial 4.0 Internacional.

