

“

Efeitos do extrato de bagaço de uvas na esteatose hepática, uma avaliação *in vitro*

| Camila **Rubia**
| UNICAMP

| Alessandra **Gambero**
| PUCG

| Juliana Alves **Macedo**
| UNICAMP

RESUMO

A doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA) é uma das doenças hepáticas mais comuns no mundo. A esteatose hepática, basicamente, pode ser definida como o acúmulo de lipídios no fígado. Os compostos fenólicos dos alimentos têm recebido atenção devido aos seus possíveis efeitos benéficos à saúde, e as uvas e seus resíduos são fontes ricas nesses compostos. Muitos estudos apontam as biotransformações enzimáticas como alternativa para melhorar a biodisponibilidade e bioatividade dos compostos fenólicos. O objetivo deste trabalho foi avaliar se extratos fenólicos obtidos com resíduos industriais de uva, antes e após a biotransformação com tanase (tanino acil hidrolase), são capazes de inibir o acúmulo de ácido oleico (OA) em um modelo de esteatose hepática in vitro, usando a linha de células HepG2. Seis extratos foram produzidos com bagaço de uva tinta, de uva branca, e de tinta e branca juntas, com e sem a enzima tanase. Esses bagaços são compostos por cascas, sementes e caules de uvas provenientes da indústria vinícola e de sucos do sul do Brasil. A concentração não citotóxica das amostras utilizadas (100 e 200 µg/mL) foi determinada pelo ensaio MTT. Culturas de células HepG2 foram induzidas à esteatose pelo método descrito por Gomez-Lechon et al (2007), e expostas às diferentes amostras para avaliação do acúmulo de óleo. Na grande maioria das amostras ocorreu a redução do acúmulo lipídico quando comparada ao controle, que não recebeu a intervenção. A redução do acúmulo lipídico variou entre 8 e 15%, e vale ressaltar que os extratos biotransformados com a enzima tanase, também teve efeitos positivos quando comparados aos extratos que não passaram por esse processo. Esses resultados indicam que os compostos fenólicos desse extrato de uva podem ser promissores no tratamento da esteatose hepática, pois foram capazes de reduzir o acúmulo de lipídios nas células quando comparados ao controle.

Palavras-chave: Esteatose Hepática; Bagaço de Uva; Enzima Tanase.

INTRODUÇÃO

De maneira simplificada, a esteatose hepática pode ser definida como um acúmulo excessivo de triglicerídeos nos hepatócitos.¹ Esse acúmulo lipídico pode atingir 5 a 10% do peso total do fígado.² Os triglicerídeos são os principais lipídios armazenados, mas é possível acumular ácidos graxos livres, colesterol e fosfolipídios. Estima-se que a prevalência de esteatose hepática é de cerca de 24% na população geral, e é um grave problema clínico no mundo, principalmente em razão do aumento de risco de progressão para alterações necroinflamatórias mais sérias, como cirrose e câncer hepático.^{3,36,37}

A esteatose hepática ocorre por várias razões, e existem duas condições principais associadas: a doença hepática gordurosa alcoólica (DHGA) e a doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA), que em geral está associada a causas metabólicas e nutricionais, principalmente obesidade.^{5,6} Hepatites virais e consumo de algumas drogas (quimioterápicas e esteroides) também podem induzir ao acúmulo lipídico hepático.⁴ Resistência insulínica é um dos distúrbios metabólicos presentes no processo de esteatose, porém não se tem muito estabelecido se essa seria uma causa, ou mais um efeito da doença.^{2,44}

Nos últimos anos, levantou-se também a possibilidade de um novo fator que induz ao acúmulo lipídico hepático: o aumento do consumo de frutose. Diversos estudos epidemiológicos relacionam o consumo exagerado de frutose com doenças metabólicas, e isso se deve em parte pelo aumento da lipogênese induzida pela frutose, já que a frutose ingerida na dieta, ao contrário da glicose, é preferencialmente metabolizada no fígado.^{40,41} Os mecanismos que induzem a essa lipogênese em excesso ainda não são completamente elucidados, porém acredita-se que tal fato ocorra devido a ação eficiente da hexoquinase e aldolase B, fundamentais no processo.^{42,43}

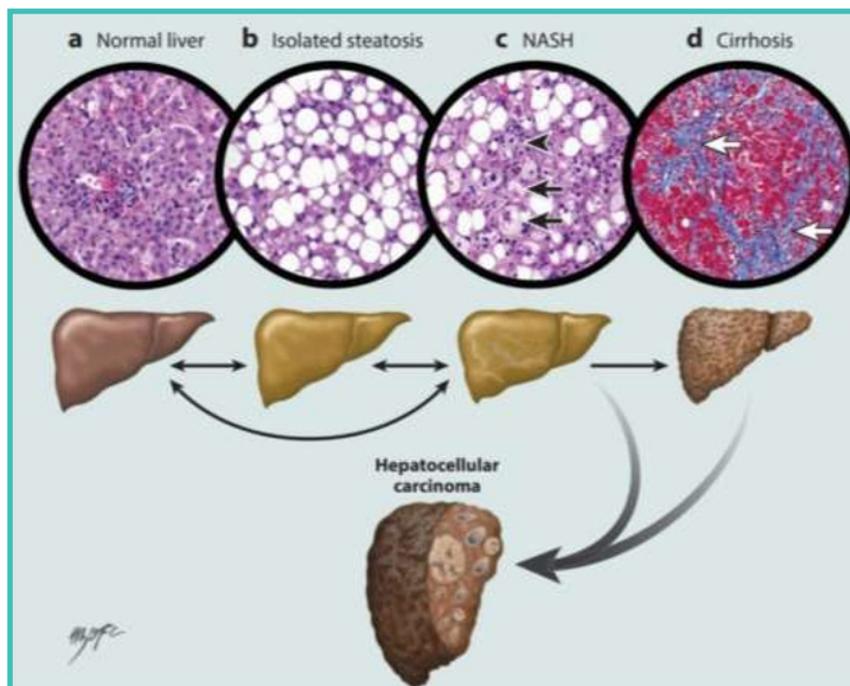
Os dados exatos ainda são desconhecidos, mas com o aumento das taxas de obesidade nas últimas décadas, estima-se que a incidência de DHGNA esteja aumentando na mesma proporção. Calcula-se que a prevalência de DHGNA na população adulta é de cerca de 25%.^{6,7,8} Na população obesa, essa prevalência é cerca de ^{4,6} vezes maior do que em pessoas não obesas.² A DHGNA também é mais comum nos homens do que nas mulheres.

A DHGNA pode ser dividida em 2 tipos: o primeiro é o fígado gorduroso não alcoólico, que é uma esteatose hepática sem inflamação e fibrose exacerbadas. Geralmente é uma condição condicional benigna e reversível, com menor risco de progressão para cirrose ou insuficiência hepática. O segundo tipo é a esteato-hepatite não alcoólica (EHNA/NASH). Nessa condição, a inflamação está presente, causando lesão hepática e possível necrose celular, com maior risco de progressão para uma condição grave.^{7,9}

A patogênese da DHGNA/NASH não é completamente elucidada. Primeiramente ocorre o depósito lipídico macrovesicular nos hepatócitos, acredita-se que tal fato ocorra devido à

resistência à insulina, obesidade e também por desregulação metabólica. Posterior a isso, a inflamação em si começa e aumentando então a possibilidade de uma evolução para fibrose e outros. O estresse oxidativo que ocorre no processo inflamatório é responsável por induzir a produção das enzimas P450, que promovem, dentre outras coisas, a peroxidação lipídica e a disfunção mitocondrial.⁷ Durante esse processo, acredita-se também que ocorre a deposição de ferro nos hepatócitos, aumentando ainda mais os danos.¹⁰

Figura 1. Espectro da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA). - (a) Fígado normal; (b) Esteatose isolada; (c) Esteato-hepatite não alcoólica (NASH); (d) Cirrose; Câncer hepático – Arab et al (2018)³⁹



A maioria dos pacientes com DHGNA é assintomática. Quando ocorrem sintomas, esses costumam ser pouco específicos como fadiga e dor abdominal no quadrante superior direito, e ocasionalmente prurido e náuseas. Sintomas mais específicos como ascite, icterícia, sangramento gastrointestinal e hipertensão portal costumam aparecer em pacientes com o quadro já em estágio evoluído, quando a cirrose já está estabelecida.⁴⁴ No exame físico, a característica mais comum é a obesidade e hepatomegalia, que costuma aparecer em até 75% dos pacientes.⁴⁵

A alta prevalência de obesidade e suas comorbidades, como é o caso da DHGNA, fazem com que a atenção a alimentação cresça e se torne mais evidente a cada dia. Nesse sentido, os chamados nutracêuticos podem auxiliar no caminho para a adoção de um estilo de vida mais saudável. Nutracêuticos podem ser definidos como alimentos, parte de alimentos ou nutrientes que são administrados em formas farmacêuticas.³⁸ Nesse sentido, a necessidade do setor industrial em atender as exigências do mercado, e assim fornecer esses produtos que possam contribuir para um melhor qualidade de vida do consumidor, tem impulsionado pesquisas a respeito dos compostos bioativos, principalmente os compostos

fenólicos. Frutas e vegetais são importantes fontes desses compostos, que são encontrados tanto nas cascas, bagaço, polpa e sementes. Dentre as frutas ricas em compostos fenólicos, destacam-se as uvas. Flavonóides, estilbenos, ácidos fenólicos e taninos compõe a enorme lista de compostos fenólicos que podem ser encontrados em uvas.¹²

Concomitante a isso, temos também o crescimento do setor de alimentos e agricultura, resultando, conseqüentemente, no aumento na produção de resíduos agroindustriais. Dessa maneira, a ideia de aproveitar e agregar valor a esses resíduos gerados pela indústria tem se tornado cada vez mais interessante, pois além de contribuição na preservação do meio ambiente, esses resíduos têm grande potencial para a geração de novas fontes de renda para indústria de alimentos e até mesmo farmacêutica.

O Brasil ocupou o 13º lugar na produção mundial de uvas em 2015, atingindo quase 1.500.00 toneladas de uvas. Mais da metade dessa produção se destina ao processamento (vinho, sucos e derivados). A EMBRAPA estima que 25% das uvas processadas se tornam resíduos. Estudos indicam que durante a produção de seis litros de vinho, ocorra o descarte de um quilograma de bagaço.^{13,14}

Os resíduos industriais das uvas são uma fonte importante de compostos fenólicos e fibras.^{15,16} Estudos anteriores tem mostrado os potenciais efeitos antiinflamatórios¹⁷, anti-proliferativos¹⁸ e a atividade antitumoral¹⁹ do bagaço de uva.

Além do aproveitamento de resíduos industriais de baixo valor agregado como fonte de compostos fenólicos, uma importante inovação proposta por esse trabalho é a biotransformação dos polifenóis dos resíduos de industriais de uva, pela ação da enzima tanase, gerando um produto com perfil de composição de polifenóis diferente dos obtidos por simples extração. Extratos biotransformados de fenólicos de uva já apresentaram respostas importantes na diminuição de processos inflamatórios na mucosa intestinal quando comparados a uma padrão de polifenol isolado.²⁰

Uma enzima com potencial para alterar o perfil fenólico das matrizes é a tannase, ou tanino acil-hidrolase (E.C: 3.1.1.20). É uma glicoproteína com ação enzimática capaz de hidrolisar as conexões éster de taninos hidrolisáveis. É formado por uma esterase de ácido gálico e uma depsidase, produzindo glicose e ácido gálico. Sua ação catalítica é a despolimerização e desglicosilação, modificando extensivamente o perfil de compostos fenólicos em um extrato e sua conseqüente bioatividade.²¹

As reações catalisadas pela tanase são capazes de aumentar a capacidade antioxidante do produto final e liberar polifenóis de suas matrizes, facilitando a absorção no trato gastrointestinal.²²

Este projeto teve como objetivo avaliar o potencial de extratos biotransformados fenólicos de bagaço de uva em modular a acumulação lipídica por hepatócitos in vitro. Esse

efeito potencial pode ser explorado convertendo resíduos agroindustriais em ingredientes funcionais de alto valor para a indústria de alimentos, com alegações que promovem a saúde.

MATERIAIS E MÉTODOS

Preparo das amostras

Resíduos das uvas

Resíduos de vinificação de uva branca (Moscato Branco) proveniente do Estado do Rio Grande do Sul, uva tinta (Máximo IAC 138-22), variedade híbrida de uvas Syrah (75%) e Seibel (25%), provenientes de São Paulo e Rio Grande do Sul, e mistura de ambos os tipos, formando o terceiro resíduo, foram coletados durante período de produção (Janeiro a Março) do ano de 2013. Os resíduos são constituídos de cascas e sementes. Os resíduos foram congelados (-18°C), liofilizados e moídos até sua transformação em pó e armazenados à -18°C.

Preparo dos extratos fenólicos biotransformados com Tanase

Os extratos de resíduos de uvas biotransformados foram preparados a partir do pó de cada tipo de uva (tinta, branca e mix). Para a produção dos extratos, 5 U de atividade de tanase junto à 100 mg de pó de uva foram adicionados à 1 mL de tampão acetato 0.02M pH 5,0 e foram submetidas à agitação em agitador orbital (Fermentation Design Incorporated, Allentown, EUA) a 200 rpm por 5h à 40°C. A reação é paralisada em banho de gelo por 15 minutos.

Um mL de metanol foi adicionado à mistura e novamente ocorreu a homogeneização por mais 50 minutos em agitador orbital (Fermentation Design Incorporated, Allentown, EUA) a 150 rpm e temperatura ambiente (25°), e posteriormente a amostra permaneceu mais 10 minutos em ultrassom. As amostras foram centrifugadas em centrífuga (Centrífuga Himac, Hitachi, Tokyo, Japan) à 10000 RPM por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi removido. O sobrenadante foi então rotoevaporado, até que a amostra reduziu-se à 50% do volume inicial, garantindo a evaporação do metanol, sobrando apenas o tampão. A amostra foi congelada em ultrafreezer e liofilizada em liofilizador de bancada (Liotop L101, Liobras, São Carlos, São Paulo, Brasil) durante 144 horas.

Para fins de controle, os extratos fenólicos das amostras, sem a etapa de biotransformação enzimática com a tanase, obtidos apenas pela extração com solventes, foram preparados da mesma forma descrita a cima.

A produção da enzima tanase

A enzima tanase foi produzida conforme estudo de Battestin; Macedo (2007)²³ com modificações, utilizando o fungo *Paecilomyces variotii*, selecionado por Macedo et al. (2005)²⁴. O micro-organismo foi cultivado em placas de petri com meio ágar batata-PDA (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) contendo 0,5% (m/v) de ágar e 0,2% (m/v) de ácido tânico (Tanal B, Prozyn BioSolution, São Paulo, Brasil) e incubado a 30°C por 72 horas em estufa (Fanem, São Paulo, Brasil). O inóculo foi mantido sob refrigeração a 7°C até o momento do uso. A fermentação ocorreu em frasco de Erlenmeyer de 500 mL por meio de fermentação sólida, contendo 20 g de farelo de trigo (Natu's, Hortolândia, Brasil), 20 mL de água destilada e 10% de ácido tânico (m/m) (Tanal B, Prozyn BioSolution, São Paulo, Brasil). O meio de cultivo foi esterilizado a 121°C por 15 minutos e inoculado com suspensão de células de 9×10^6 células/mL. A suspensão de células foi produzida em homogeneizador do tipo Turrax (ULTRA-TURRAX®, IKA, Staufen, Alemanha) a partir da adição de 20 áreas circulares de 1,54 cm² (d = 1,4 cm), retiradas da placa de PDA inoculada, em 200 mL de água destilada estéril, sendo a contagem dos esporos feita em Câmara de Neubauer. Os frascos de Erlenmeyers foram incubados em estufa a 30°C por 120 horas.

Após a fermentação, à extração das enzimas realizou-se com a adição de 160 mL de tampão acetato 20 mmol/L pH 5,0 e agitação em agitador orbital (Fermentation Design Incorporated, Allentown, EUA) a 200 rpm por 1 hora. O extrato foi filtrado e então, centrifugado a 9630 xg por 30 minutos a 4°C (Centrífuga Himac, Hitachi, Tokyo, Japan). O sobrenadante foi tratado com sulfato de amônio (Ecibra, Santo Amaro, São Paulo, Brasil) em concentração final de 80% de saturação (561 g/L) e mantido sob refrigeração por 12 horas. O precipitado formado foi recolhido por centrifugação a 9630 xg por 30 minutos à 4°C e ressuspenso em água destilada para então, ser submetido à diálise em tubo de membrana de celulose (Sigma-Aldrich, Steinhein, Alemanha) por 48 horas em água destilada a fim de remover o excesso de sulfato de amônio. O extrato semi purificado obtido foi congelado a -18°C e liofilizado em liofilizador de bancada (Liotop L101, Liobras, São Carlos, São Paulo, Brasil) durante 24 horas. O extrato semi purificado liofilizado foi mantido a -18°C.

Atividade enzimática Tanase

A atividade do extrato bruto de tanase foi determinada de acordo com o método de Sharma *et al.*, 2000²⁵, com uma curva padrão absorvância de soluções de ácido gálico. A atividade enzimática específica foi expressa como U/mg de proteína, considerando-se U como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 µmol de ácido gálico por minuto. O teor de proteínas do extrato enzimático foi determinado por Bradford, 1976²⁶.

Avaliação do potencial anti esteatótico dos extratos obtidos em ensaios celulares

Culturas celulares

Utilizou-se a linhagem HepG2 de murinos, adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro. A linhagem foi cultivada em meio de cultura Dulbecco's modified Eagle (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 10 mL/L de penicilina/estreptomicina (Gibco BRL, NY, USA), a 37°C, em atmosfera contendo 5% de CO₂.

Avaliação da ação citotóxica dos extratos

Uma possível ação citotóxica dos extratos produzidos foi monitorada pelo ensaio de MTT. O ensaio de MTT consiste em um teste de redução do sal de tetrazólio (MTT – 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue) descrito por MOSMANN (1983). Células foram cultivadas em DMEM (alta glicose), 10% Soro fetal bovino e suplementadas com 25 mM de HEPES, pH 7.4; 4 mM de L-glutamina; 40 µg/ml de penicilina; 90 µg/ml de estreptomicina e 1,2 g/L de NaHCO₃. As células foram transferidas para placas de 96 poços por 24 horas antes de receberem os extratos a serem testados, em diversas concentrações, por 24 horas. As células foram então submetidas ao ensaio de MTT. Alíquotas de células receberam MTT (5mg/ml) e foram incubadas por 3 horas (37°C, 5% CO₂), em seguida adicionou-se 100 µl de sulfato de dodecil de sódio 10% (SDS) em HCl 0,01M. A placa foi mantida por 18h, a 37°C, 5% de CO₂ e a absorbância das amostras lida em 540nm, usando leitor de microplaca. Controles positivos e negativos de viabilidade celular foram avaliados, assim como um controle da citotoxicidade dos solventes das amostras também.

Tratamentos da cultura celular

As células HepG2 foram cultivadas em placas de 96 poços a uma densidade de 5×10^5 células / poço por 24 h. Em seguida, as células foram privadas de FBS. No dia 4, as células HepG2 foram tratadas com ácido oleico (OA; Sigma-Aldrich) em concentração de 0,2 mM por 24 h para induzir o acúmulo de AO celular. O tratamento com extratos de uva ocorreu no mesmo período. As células de controle foram tratadas com AO.

Coloração por Oil Red-O

Ao final do tratamento, as células foram lavados uma vez com formaldeído 10% em PBS e fixados com formaldeído 10% em PBS por 60 minutos. Após isso, o formaldeído foi substituído por PBS com 60% de isopropanol, e as células coradas durante 60 minutos em

solução de Oil Red-O (Sigma) diluído em com 60% de isopropanol. Após essa etapa, as células foram lavadas quatro vezes com água, e os poços secos à temperatura ambiente. Posteriormente o Oil Red-O das células coradas foi eluído com isopropanol 100%. A absorvância foi medida em leitor de microplacas à 492 nm. Cada tratamento foi feito em triplicatas, e os resultados expresso pela equação abaixo:

$$\% \text{ de Oil Red-O} = (\text{Abs amostra} / \text{Abs controle}) \times 100$$

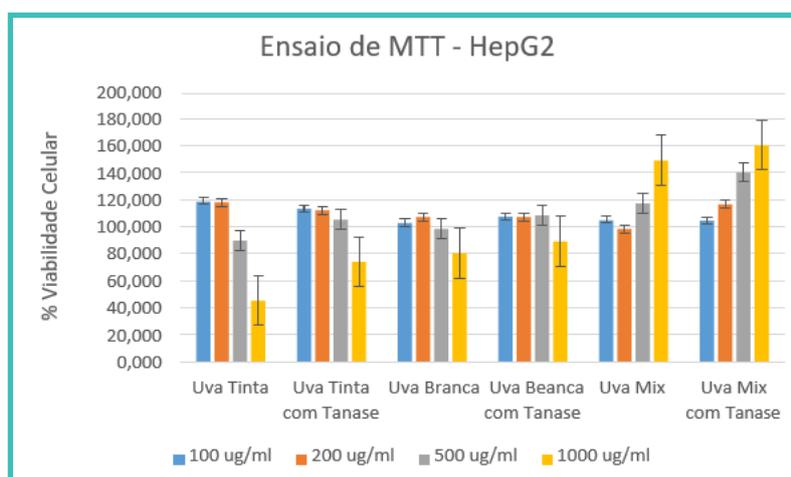
Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados utilizando o software estatístico GraphPad Prism 5 for Windows versão 5.0 (GraphPad Software Inc.). As comparações entre grupos de dados foram realizadas usando uma ANOVA unidirecional seguida por várias comparações de Dunnett e Tukey. Uma probabilidade associada (valor p) inferior a 5% foi considerado significativo ($p < 0,05$).

RESULTADOS

De acordo com o ensaio MTT, alguns dos extratos foram tóxicos para a linhagem celular Hep-G2 nas concentrações testadas (Figura 2). Em concentrações mais altas (500 e 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$) ocorreu uma diminuição da viabilidade celular para amostras de uva tinta com e sem biotransformação, e para uva branca também com e sem biotransformação. Para outras amostras, uva mix e mix biotransformada, o efeito foi contrário, a viabilidade celular foi maior que as outras concentrações. É importante lembrar que esse aumento não significa necessariamente que ocorreu uma proliferação celular, às vezes ocorre apenas um aumento na atividade mitocondrial dessas células. Portanto, as concentrações consideradas seguras para continuar com os seguintes ensaios celulares foram de 100 e 200 $\mu\text{g} / \text{ml}$.

Figura 2. Viabilidade celular de acordo com o ensaio de MTT.



Após a determinação de concentrações de amostras segura para a cultura celular, realizou-se um ensaio simulando um modelo de esteatose hepática, afim de verificar um possível efeito das amostras na redução do acúmulo lipídico final em comparação ao controle (Tabela 1).

Tabela 1. Coloração por Oil Red-O comparando amostras em relação ao controle (%)

	100 µg/ml	200 µg/ml
Uva Tinta (UT)	92,74 ± 0,023 ^{a,a}	109,56 ± 0,034 ^{b,a}
Uva Tinta Tanase (UTT)	91,01 ± 0,0095 ^{a,a}	93,361 ± 0,007 ^{a,b}
Uva Branca (UB)	89,27 ± 0,002 ^{b,a}	87,94 ± 0,011 ^{b,a}
Uva Branca Tanase (UBT)	88,66 ± 0,002 ^{b,a}	84,88 ± 0,003 ^{b,a}
Uva Mix (UM)	91,31 ± 0,027 ^{a,a}	88,45 ± 0,003 ^{b,a}
Uva Mix Tanase (UMT)	89,75 ± 0,004 ^{b,a}	90,60 ± 0,016 ^{b,a}

Todos os experimentos foram realizados em triplicata, e os valores são apresentados como média ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Dunnett, e Tukey, respectivamente ($p \leq 0,05$)

Em todas as amostras e concentrações (com exceção da UT na concentração de 200 µg/ml) ocorreu um redução do acúmulo lipídico quando comparado ao controle, que não recebeu nenhum tratamento. Essa diminuição do acúmulo de lipídios variou entre 8 e 15%. Os melhores resultados foram encontrados nas células tratadas com UBT, onde a redução lipídica chegou a ser de 15,12%. Todas as amostras biotransformadas com a enzima Tanase obtiveram um resultado levemente melhor do que quando comparadas a amostra semelhante que não recebeu a biotransformação.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Ao longo das últimas décadas, os processos de urbanização e globalização vem modificando negativamente a dieta da população ocidental. O aumento no consumo de açúcar, gorduras, sódio e aditivos químicos cresceu exageradamente. Paralelo a isso, o sedentarismo também teve um aumento significativo. Em consequência dos nossos atos, estatísticas sobre o aumento de doenças crônicas não transmissíveis só vem crescendo a cada dia. Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) sugerem que cerca de 3,4 milhões de adultos morrem a cada ano como resultado do sobrepeso e da obesidade. No Brasil a prevalência de obesidade no Brasil passou de 11,8% em 2006 para 18,9% em 2016. Como consequência desse aumento da obesidade, a incidência de DHGNA ganhou espaço nos últimos anos, e por isso, o papel positivo dos polifenóis, incluindo os presentes nas uvas, para prevenir a inflamação mediada pela obesidade e outras doenças metabólicas, tem sido demonstrados em muitos estudos.²⁷

Elevados níveis de ácidos graxos livres no plasma (AGLs) estão implicados nas patologias da DHGNA. Esses AGLs que podem se acumular nos hepatócitos e depois formar

gotículas lipídicas.³ Histologicamente, quando mais de 5% dos hepatócitos mostram um acúmulo visível de gotículas lipídicas, temos uma esteatose hepática configurada. Assim, o modelo in vitro de esteatose induzida por OA em células Hep G2, apesar de não ser preciso, pode ser utilizado para o estudo da doença hepática gordurosa e possíveis tratamentos.⁶

O estresse oxidativo, e conseqüentemente a geração excessiva de radicais livres, é capaz de causar peroxidação de lipídios, fazendo parte do processo de fibrose hepática. Assim, o consumo de suplementos antioxidantes poderia proteger as células contra o estresse oxidativo.⁷ No presente estudo, o tratamento com extratos de uva mostrou uma diminuição no acúmulo de lipídios quando comparado ao controle.

Estudos anteriores demonstraram efeitos positivos no uso de bagaço de uva no tratamento do metabolismo lipídico hepático. Em modelos in vivo encontramos diversos exemplos dos benefícios hepatopáticos do consumo de extratos e/ou uvas de mesa em ratos camundongos. Van Hul e colaboradores mostraram que os ratos que receberam uma dieta rica em gorduras aumentam o conteúdo lipídico total em ~ 40%.²⁸ O grupo que recebeu tratamento com extrato de bagaço de uva atenuou esse efeito. Além da normalização dos níveis de triglicerídeos, a análise histológica confirmou gotículas lipídicas menores no fígado em ratos que consumiram o extrato de bagaço de uva. Charradi e colaboradores também demonstraram efeito hepatoprotetor semelhante no seu estudo. Os ratos também receberam dieta rica em gordura, e o grupo que foi suplementado com uma mistura de sementes de uva e extrato de pele não apresentou efeitos deletérios induzidos pela dieta rica em gordura, como estresse oxidativo, queda de glutathione e depleção drástica no zinco hepático.²⁹ Existem também evidências de que o consumo de sementes de uva foi capaz de atenuar marcadores inflamatórios, como a PCR, no fígado de ratos obesos Zucker, machos.³⁰

A suplementação de extrato de bagaço de uva em camundongos por 10 semanas foi capaz de reduzir significativamente o peso corporal, o acúmulo de lipídios hepáticos quando comparado ao grupo que não recebeu o extrato. Além disso, o nível plasmático de leptina era mais baixo, assim como o ativador de enzimas lipogênicas foi suprimido.³¹

Estudos in vitro com células HepG2, e modelos semelhantes ao aplicado nesse trabalho, também mostraram resultados promissores. Como o acúmulo de triglicerídeos proveniente do desequilíbrio entre síntese e excreção desse composto nos hepatócitos é a principal característica da esteatose hepática, a redução na quantificação de lipídios indica possíveis resultados promissores na prevenção e/ou controle da doença.³⁵ Os resultados obtidos nesse estudo condizem com diversos relatos expostos na literatura. Tang e colaboradores expuseram as células HepG2 a um meio misto, composto por ácido oleico e álcool, afim de que ocorresse um acúmulo lipídico ainda maior. O modelo resultou na formação de um número maior de gotículas lipídicas no citoplasma das células quanto comparado ao grupo

controle. As células ainda receberam tratamento com resveratrol, composto presente em grande quantidade nos extratos de uva. Dados mostram que as células tratadas com resveratrol acumularam menos lipídio.³²

Um extrato feito à base de mirtilos, matriz também rica em polifenóis e antocianinas, assim como as uvas, mostrou um potencial efeito inibitório contra o acúmulo lipídico em modelo de esteatose in vitro. Células que receberam tratamento com o extrato de mirtilo, chegaram a acumular até 40% menos gordura quando comparadas as células que não receberam esse tratamento.³³

Extratos feitos com diferentes tipos de berries como amoras, mirtilos, morangos e arônias (chokeberry) foram investigados quanto a um possível poder inibitório do acúmulo de gordura hepática. Todos os extratos apresentaram resultados positivos, principalmente o extrato a base de amoras que chegou a depurar os lipídios em até 30% quando comparado ao controle, que não recebeu a intervenção.³⁴

Os resultados obtidos nesse trabalho, tal qual resultados alcançados com matrizes semelhantes e já publicados na literatura, indicam um potencial promissor dos extratos fenólicos feitos a partir dos resíduos de uva na redução do acúmulo lipídico hepático. Vale ressaltar também que a biotransformação enzimática contribuiu, mesmo que de maneira sutil, para melhores resultados quando comparados a mesma matriz sem a ação da enzima Tanase. Esse processo de biotransformação, portanto, também se mostra promissor no aproveitamento, e conseqüente enriquecimento, de resíduos industriais.

REFERÊNCIAS

IDILMAN, I. S.; OZDENIZ, I.; KARCAALTINCABA, M. Hepatic Steatosis: Etiology, Patterns, and Quantification. *Seminars in Ultrasound, CT and MRI*, 2016.

ÂNGULO P, LINDOR KD. Non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol*; 17 Suppl:S186–S190, 2002.

LORIA P, LONARDO A, LOMBARDINI S, et al. Epidemiologia e storia naturale delle epatopatia steatosica nonalcolica. *Ann Ital Med Int*; 18: 15S– 31S, 2003.

SODER, R.B.; BALDISSEROTTO, M. Hepatic steatosis in obese children: imaging investigatio. *Scientia Medica, Porto Alegre*, v. 19, n. 4, p. 202-208, out./dez. 2009

IDILMAN, I. S., OZDENIZ, I., & KARCAATINCABA, M. Hepatic Steatosis: Etiology, Patterns, and Quantification. *Seminars in Ultrasound, CT and MRI*, 37(6), 501–510, 2016.

LOOMBA R, SANYAL AJ. The global NAFLD epidemic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* ;10:686–90, 2013.

SWEET, P. H., KHOO, T., & NGUYEN, S. Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Primary Care: Clinics in Office Practice*, 44(4), 599–607, 2017.

- FARRELL, G. C., WONG, V. W. & CHITTURI, S. NAFLD in Asia—as common and important as in the West. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 10, 307–318, 2013.
- BELLENTANI S, MARINO M. Epidemiology and natural history of non- alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Ann Hepatol*;8(1):S4–8, 2009.
- SHIM JJ. Body iron, serum ferritin, and nonalcoholic fatty liver disease. *Korean J Hepatol* ;18(1):105–7, 2012.
- ABD EL-KADER SM, EL-DEN ASHMAWY EM. Non-alcoholic fatty liver disease: the diagnosis and management. *World J Hepatol* ;7(6):846–58, 2015.
- FRANCIS, F.J. Anthocyanins and betalains: composition and applications. *Cereal Foods World*. Chicago, V.45, P.208-213, 2000.
- MELLO, L.M.R. de. O Brasil no contexto do Mercado vitivinícola mundial: panorama 2015. Bento Gonçalves, RS. Embrapa Uva e Vinho, 2016. (Embrapa Uva e Vinho. Comunicado técnico, 192), 2015.
- TOURNOUR, H. H. et al. Valorization of grape pomace: Extraction of bioactive phenolics with antioxidant properties. *Industrial crops and products*, v. 74, p. 397–406, 2015.
- FONTANA, A. R.; ANTONIOLLI, A.; BOTTINI, R. Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: extraction, characterization, and biotechnological applications of phenolics. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 61, n. 38, p. 8987–9003, 2013.
- YU J, AHMEDNA M. Functional components of grape pomace: their composition, biological properties and potential applications. *Int J Food Sci Tech* 48:221-37, 2013.
- MARTINS, I. M., MACEDO, G. A., MACEDO, J. A., ROBERTO, B. S., CHEN, Q., BLUMBERG, J. B., et al. Tannase enhances the anti-inflammatory effect of grape pomace in Caco-2 cells treated with IL-1 β . *Journal of Functional Foods*, 29, 69–76, 2017.
- YU, J., & AHMEDNA, M. Functional components of grape pomace: Their composition, biological properties and potential applications. *International Journal of Food Science & Technology*, 2013.
- LUO, J., WEI, Z., ZHANG, S., PENG, X., HUANG, Y., ZHANG, Y., & LU, J. Phenolic Fractions from Muscadine Grape “Noble” Pomace can Inhibit Breast Cancer Cell MDA-MB-231 Better than those from European Grape “Cabernet Sauvignon” and Induce S-Phase Arrest and Apoptosis. *Journal of Food Science*, 82(5), 1254–1263, 2017.
- MARTINS, I. M. et al. Enzymatic biotransformation of polyphenolics increases antioxidant activity of red and white grape pomace. *Food research international*, v. 89, n. Pt 1, p. 533–539, nov. 2016.
- FERREIRA, L. R.; MACEDO, J. A.; RIBEIRO, M. L.; MACEDO, G. A. Improving the chemopreventive potential of orange juice by enzymatic biotransformation. *Food Res. Int.* 51 (2), 526–535, 2013.
- MACEDO, J. A.; BATTESTIN, V.; RIBEIRO, M. L.; MACEDO, G. A. Increasing the antioxidant power of tea extracts by biotransformation of polyphenols. *Food Chemistry*, v. 126, n. 2, p. 491–497, 2011.
- BATTESTIN, V.; MACEDO, G. Tannase production by *Paecilomyces variotii*. *Bioresource technology*, v. 98, n. 9, p. 1832–1837, 2007.
- MACEDO, G. A.; MATSUDA, L. K.; BATTESTIN, V. Seleção de fungos produtores de tanase em resíduos vegetais ricos em taninos. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 29, n. 4, p. 833–838, 2005

- SHARMA, S.; BHAT, T. K.; DAWRA, R. K. A Spectrophotometric Method for Assay of Tannase Using Rhodanine. *Analytical biochemistry*, v. 279, n. 1, p. 85–89, 2000.
- BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical biochemistry*, v. 72, n. 1-2, p. 248–254, 1976.
- CHUANG C, MCINTOSH M. Potential mechanisms by which polyphenol-rich grapes prevent obesity-mediated inflammation and metabolic diseases. *Ann Rev Nutr.* 31:155–176, 2011.
- VAN HUL, M.; GEURTS, L.; PLOVIER, H.; et al. Reduced obesity, diabetes, and steatosis upon cinnamon and grape pomace are associated with changes in gut microbiota and markers of gut barrier. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, v. 314, n. 4, p. E334–E352, 2018
- CHARRADI, K.; ELKAHOUI, S.; KARKOUCH, I.; et al. Protective effect of grape seed and skin extract against high-fat diet-induced liver steatosis and zinc depletion in rat. *Digestive diseases and sciences*, v. 59, n. 8, p. 1768–1778, 2014.
- TERRA, X., MONTAGUT, G., BUSTOS, M., LLOPIZ, N., ARDÈVOL, A., BLADÉ, C., ... BLAY, M. Grape-seed procyanidins prevent low-grade inflammation by modulating cytokine expression in rats fed a high-fat diet. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 20(3), 210–218, 2009.
- PARK, H.-J., JUNG, U. J., LEE, M.-K., CHO, S.-J., JUNG, H.-K., HONG, J. H., ... CHOI, M.-S. Modulation of lipid metabolism by polyphenol-rich grape skin extract improves liver steatosis and adiposity in high fat fed mice. *Molecular Nutrition & Food Research*, 57(2), 360–364, 2012.
- TANG, L. Y., CHEN, Y., RUI, B. B., & HU, C. M. Resveratrol ameliorates lipid accumulation in HepG2 cells, associated with down-regulation of lipin1 expression. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 94(2), 185–189, 2016.
- LIU, Y., WANG, D., ZHANG, D., LV, Y., WEI, Y., WU, W., ... JI, B.. Inhibitory Effect of Blueberry Polyphenolic Compounds on Oleic Acid-Induced Hepatic Steatosis in Vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(22), 12254–12263, 2011.
- WANG, Y., ZHAO, L., WANG, D., HUO, Y., & JI, B. Anthocyanin-rich extracts from blackberry, wild blueberry, strawberry, and chokeberry: antioxidant activity and inhibitory effect on oleic acid-induced hepatic steatosis in vitro. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(7), 2015.
- FONG DG, NEHRA V, LINDOR KD and BUCHMAN AL, Metabolic and nutritional considerations in nonalcoholic fatty liver. *Hepatology* 32:3–10 (2000).
- ONG JP, YOUNOSSI ZM. Epidemiology and natural history of NAFLD and NASH. *Clin Liver Dis.* 2007;11:1–16.
- MONJARDIM, R. DA F.; DA FONSECA MONJARDIM, R.; COSTA, D. M. C.; et al. Diagnosis of hepatic steatosis by contrast-enhanced abdominal computed tomography. *Radiologia Brasileira*, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/s0100-39842013000300005>>
- MORAES FP, COLLA LM. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. *Rev Eletr Farm* 2006;3(2):109-122
- ARAB, J. P., ARRESE, M., & TRAUNER, M. (2018). Recent Insights into the Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 13(1), 321–350.
- SOFTIC, S.; COHEN, D. E.; KAHN, C. R. Role of Dietary Fructose and Hepatic De Novo Lipoge-

nesis in Fatty Liver Disease. *Digestive diseases and sciences*, v. 61, n. 5, p. 1282–1293, 2016.

TER HORST, K. W.; SERLIE, M. J. Fructose Consumption, Lipogenesis, and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Nutrients*, v. 9, n. 9, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3390/nu9090981>>.

HERMAN, M. A.; SAMUEL, V. T. The Sweet Path to Metabolic Demise: Fructose and Lipid Synthesis. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, v. 27, n. 10, p. 719–730, 2016.

BARREIROS, R. C.; BOSSOLAN, G.; TRINDADE, C. E. P. Frutose em humanos: efeitos metabólicos, utilização clínica e erros inatos associados. *Revista de Nutrição*, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/s1415-52732005000300010>>

CARVALHEIRA, J. B. C.; SAAD, M. J. A. Doenças associadas à resistência à insulina/hiperinsulinemia, não incluídas na síndrome metabólica. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/s0004-27302006000200022>>.

SASS, D. A.; CHANG, P.; CHOPRA, K. B. Nonalcoholic fatty liver disease: a clinical review. *Digestive diseases and sciences*, v. 50, n. 1, p. 171–180, 2005.