



**Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Instituto Biomédico
Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular**

Efeitos dos compostos bioativos da uva *Sweet jubilee* na linhagem celular de câncer de próstata

Lauriza Silva dos Santos

Orientador: Prof. Dr. Anderson Junger Teodoro
Coorientadora: Profa. Dra. Mariana Simões Larraz Ferreira

Rio de janeiro
2021

Lauriza Silva dos Santos

Efeitos dos compostos bioativos da uva *Sweet jubilee* na linhagem celular de câncer de próstata

Dissertação de mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia Molecular e Celular da
Universidade Federal do Estado do Rio
de Janeiro como parte dos requisitos
necessários à obtenção do grau de
Mestre em Biologia Molecular e Celular.

Prof. Dr. Anderson Junger Teodoro
Profa. Dra. Mariana Simões Larráz Ferreira

Rio de Janeiro
2021

Ficha catalográfica - no verso da folha anterior

d237 dos Santos, Lauriza Silva
Efeitos dos compostos bioativos da uva Sweet
jubilee na linhagem celular de câncer de próstata /
Lauriza Silva dos Santos. -- Rio de Janeiro, 2021.
69p

Orientador: Anderson Junger Teodoro.
Coorientador: Mariana Simões Larraz Ferreira.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do
Estado do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação
em Biologia Molecular e Celular, 2021.

1. Sweet Jubilee. 2. Compostos Bioativos. 3.
Adenocarcinoma de Próstata. 4. Vitis vinifera. I.
Teodoro, Anderson Junger, orient. II. Ferreira,
Mariana Simões Larraz, coorient. III. Título.

Lauriza Silva dos Santos

Efeitos dos compostos bioativos da uva *Sweet jubilee* na linhagem celular de câncer de próstata.

Dissertação de mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia Molecular e Celular da
Universidade Federal do Estado do Rio de
Janeiro como parte dos requisitos
necessários à obtenção do grau de
Mestre em Biologia Molecular e Celular.

Banca examinadora:

Dr. Anderson Junger Teodoro- Doutor em Ciência de Alimentos - UFRJ

Dr. Cassiano Felipe Gonçalves de Albuquerque - Doutor em Biologia - Biociências
Nucleares – UERJ

Dr. Otniel Freitas-Silva - Doutor em Engenharia Química e Biológica- Universidade do Minho,
Portugal

Sumário

Lista de figuras	6
Lista de tabelas	7
Abreviaturas	8
Resumo	9
Abstract	11
Introdução	12
Produtos naturais, frutos híbridos e câncer	14
A uva	27
Câncer de próstata, tratamentos convencionais e possíveis novos tratamentos	27
Objetivo	27
Geral	27
Específicos	27
Material e Métodos	28
Amostra	28
Determinação de atividade antioxidante e compostos fenólicos	28
Atividade sequestrante do radical DPPH	28
Atividade antioxidante pela captura do radical ABTS	29
Atividade antioxidante pela redução do ferro - FRAP	29
Capacidade de absorção do radical de oxigênio - ORAC	29
Compostos fenólicos totais	30
Ensaio in vitro	31
Ensaio de viabilidade celular - MTT	31
Ensaio de ciclo celular	31
Ensaio de apoptose	32
Caracterização do perfil fitoquímico por UPLC-MSE	32
Análise estatística	34
Resultados	35
Compostos fenólicos e atividade antioxidante	35
Efeito da Sweet Jubilee em cultura de células	36
Discussão	48
Conclusão	55
Referências Bibliográficas	55

Lista de figuras

- Figura 1: Percentual de inibição da viabilidade relativo ao controle de DU145 após 24h de tratamento
- Figura 2: Percentual de inibição da viabilidade relativo ao controle de DU145 após 48h de tratamento
- Figura 3: Percentual de inibição da viabilidade relativo ao controle de PC3 após 24h de tratamento
- Figura 4: *Células DU145* Controle (A) e tratadas com extrato de SJ (1000 µg/mL) (B) e (5000 µg/mL) (C). Os quadrantes de cima para baixo em sentido horário: apoptose inicial (Anexina V+ PI-), apoptose tardia (Anexina V+ PI+), morte não apoptótica (Anexina V- PI+) e células viáveis (Anexina-PI-)
- Figura 5: *Células PC3* Controle (A) e tratadas com extrato de SJ (1000 µg/mL) (B) e (5000 µg/mL) (C). Os quadrantes de cima para baixo em sentido horário: apoptose inicial (Anexina V+ PI-), apoptose tardia (Anexina V+ PI+), morte não apoptótica (Anexina V- PI+) e células viáveis (Anexina-PI-)
- Figura 6: Projeção variável dos compostos fenolicos tentativamente identificáveis em extratos de acetona e água.
- Figura 7: Análise de agrupamento hierárquico (HCA) e mapa de calor dos compostos bioativos nos extratos de Sweet Jubille extraídos com solventes aquosos (Water) e acetanólicos (Acetone), em polpa e fruta integral.

Lista de tabelas

- Tabela 1: Tipos de Tratamento de acordo com o estágio do câncer de próstata
- Tabela 2: Compostos Fenolicos Totais (mg GAE/g) em extratos de uva SJ
- Tabela 3: Capacidade antioxidante do extrato de uva SJ por diferentes métodos
- Tabela 4: Ciclo Celular da linhagem DU145 tratada com extrato de SJ (1000-5000 µg/mL)
- Tabela 5: Ciclo Celular da linhagem PC3 tratada com extrato de SJ (1000-5000 µg/mL)
- Tabela 6: Taxa de apoptose da linhagem DU145 tratada com extrato de SJ (1000-5000 µg/mL)
- Tabela 7: Taxa de apoptose da linhagem PC#3tratada com extrato de SJ (1000-5000 µg/mL)
- Tabela 8: Identificação de compostos fenólicos por UPLC-MSE nos extratos de acetona e aquosos das amostras de uva (polpa e integral).
- Tabela 9: Classes de compostos bioativos de extratos aquoso e acetônico da uva integral e polpa

Abreviaturas

SJ	Sweet Jubilee
IFG	International Fruit Genetics
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IARC	Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (International Agency for Research on Cancer)
PSA	Antígeno prostático específico
MOH	Metanol
MOH50	Metanol 50%
SQ	Sequencial de metanol 50% e acetona 70%
A70	Acetona 70%
H2O	Água
EOH80	Etanol 80%
rpm	Rotação por minuto
DPPH	Radical 2,2-difenil-1-picrilidrazil
ABTS	Radical ácido 2,2 Azinobis (3-etil-benzotiazolina-6-sulfonato)
FRAP	Capacidade ferro-redutora
ORAC	Capacidade de absorção de radical de oxigênio
mMol	Micromolar
TPTZ	2,4,6-Tri (2-piridil) -s-triazina
µL	Microlitro
TEAC	Capacidade antioxidante equivalente de trolox
AAPH	2,2'-azobis(2-amidinopropano) dihidroclorado
AUC	A área sob a curva

nm	nanômetro
GAE	Equivalente de Ácido Gálico
PC-3	Linhagem celular de câncer de próstata humano em metástase no osso
DU145	Linhagem celular de câncer de próstata humano em metástase no cérebro
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
SFB	Soro fetal bovino
MTT	brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil- tetrazólio
DMSO	dimetilsulfóxido
CPIR	taxa de inibição da proliferação celular
fase G1	Fase 1 do ciclo de divisão celular das células eucarióticas, entre o final da mitose e início da síntese de DNA
G0	Estado estacionário do ciclo de divisão celular dos eucariotos pela entrada em uma digressão quiescente a partir da fase G1
fase G2	Fase 2 do ciclo de divisão celular das células eucarióticas, entre o final da síntese de DNA e o início da mitose
fase S	Período do ciclo celular das células eucarióticas em que ocorre a síntese de DNA
FITC	Isotiocianato de fluoresceína do inglês fluorescein isothiocyanate
UPLC-MS ^E	Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas
ANOVA	Análise de variância

Resumo

As uvas híbridas são caracterizadas por possuírem maior resistência a doenças, por produzirem frutos com melhores características sensoriais e apresentarem maior teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante. O extrato de uva integral liofilizada contém diversos compostos fenólicos que são capazes de inibir a ação de proteínas associadas à metástase e podem apresentar uma maior farmacocinética e com isso ter potencial como nutracêutico / medicamento para tratar cânceres com grande incidência como o de próstata. O objetivo deste trabalho foi caracterizar e determinar a influência dos diferentes extratos da uva *Sweet Jubilee* (SJ) nas linhagens celulares de câncer de próstata (DU145 e PC3). As amostras foram obtidas da Fazenda Labrunier localizada em Petrolina (PE) e transportadas sob refrigeração ao Núcleo de Bioquímica Nutricional da UNIRIO. Foram utilizadas soluções extratoras na amostra liofilizada: água 100% (H₂O), metanol (MOH), metanol 50% (MOH50), acetona 70% (A70), extração sequencial MOH50 e A70 (SQ) e etanol 80% (EOH80). A determinação da atividade antioxidante foi realizada por meio de distintos métodos (ABTS, FRAP, DPPH e ORAC), além da determinação de compostos fenólicos totais (Folin Ciocalteu). Foi obtido o perfil fitoquímico dos seis extratos oriundos de diferentes procedimentos de extração (H₂O, MOH, MOH50, A70, SQ e EOH80) por abordagem metabolômica por UPLC-MS^E. As linhagens em metástase DU145 (cérebro) e PC3 (osso) foram cultivadas com e sem o tratamento com a uva integral liofilizada em distintas concentrações (10-5000 µg/mL) em meio de cultura RPMI, sendo avaliada a viabilidade celular pelo método de MTT por 24, 48 e 72 horas. Foram ainda realizadas análises do ciclo celular e taxa de apoptose após 48 h de tratamento com extrato de uva (0, 1000 e 5000 µg/mL). Os extratos de SJ apresentaram elevados teores de compostos fenólicos totais e alta capacidade antioxidante *in vitro*. A caracterização dos compostos por UPLC-MS^E da SJ identificou 4 classes incluindo flavonoides, estilbenos, ácidos fenólicos e outros polifenóis. Na análise da atividade antiproliferativa, observou-se após 48h uma diminuição média da viabilidade celular de 47% e 49% (5000 µg/mL) nas linhagens DU145 e PC3, respectivamente. Foi ainda identificado um aumento do percentual de células na fase G₀/G₁, com diminuição de células nas fases S e G₂/M e maior percentual de apoptose inicial e tardia (p<0,01) após tratamento com extrato SJ na linhagem DU145. Conclui-se que a uva SJ possui altos teores de compostos fenólicos, como uma ampla diversidade de compostos bioativos, sendo identificados neste trabalho 67 compostos, abrindo perspectivas do uso extrato de uvas atuando como quimiopreventivo ou participação em terapia combinada como adjuvante no tratamento oncológico.

Palavras-chave: Adenocarcinoma de próstata; compostos bioativos; *sweet jubilee*; *Vitis vinifera*.

Abstract

Hybrid grapes are characterized for having greater resistance to disease, for producing fruits with better organoleptic characteristics, and for showing greater total phenolic content and antioxidant activity. Lyophilized whole grape extract contains several polyphenols that are able to inhibit the action of proteins associated with metastasis and can present greater pharmacokinetics and it can, then, have a greater potential to become a drug based on natural products for the most common cancers like prostate cancer. The goal of this work is to characterize and determine the influence of different Sweet Jubilee grape (SJ) extracts in the DU145 and PC3 cellular lineages. The samples were obtained from the Labrunier farm located in Petrolina (state of Pernambuco, Brazil) and transported under refrigeration to UNIRIO's Núcleo de Bioquímica Nutricional (Nutritional Biochemistry Group). The following extracting solutions were used on the lyophilized sample: water 100% (H₂O), methanol (MOH), methanol 50% (MOH50), acetone 70% (A70), sequential MOH50 and A70 (SQ) and ethanol 80% (EOH80). The antioxidant activity was evaluated through several distinct methods (ABTS, FRAP, DPPH, and ORAC), as well as the determination of total phenolic compounds (Folin Ciocalteu). From these results, the phytochemical profile of the selected extracts was determined by a metabolomic approach through UPLC-MS. The metastasized lineages DU145 (brain) and PC3 (bone) were cultivated with and without treatment with grape extract (10-5000 µg/mL), evaluating the cellular viability through the MTT method for 24, 48, and 72 hours. We also performed cellular cycle and apoptosis rate analyses after 48h of treatment with lyophilized whole grape extract (1000-5000 µg/mL). The SJ extracts showed large amounts of total phenolic compounds and great *in vitro* antioxidant capacity. The characterization of UPLC-MS compounds of SJ identified 4 classes, including: flavonoids, stilbenes, phenolic acids, and other polyphenols. In the antiproliferative activity analysis, after 48h, an average reduction in cellular viability of 47% and of 49% (5000 µg/mL) in the DU145 and PC3 lineages respectively. It was also identified an increase in the percentage of cells in the G₀/G₁ phase and decrease of cells in phases S and G₂/M and greater percentage of early and late apoptosis (p<0.01) after treatment with SJ extract in the DU145 lineage. We conclude that the SJ grape has high quantities of phenolic compounds, as well as an ample diversity of bioactive compounds, 67 compounds being identified in this work, opening new perspectives for it to act as a chemopreventive extract or participate in combined therapy as an adjuvant in oncologic treatment.

Keywords: Bioactive compounds, prostate adenocarcinoma, *sweet jubilee*, *Vitis vinifera*

1 Introdução

A videira do gênero *Vitis* pertencente à família *Vitaceae*, uma das culturas mais antigas e importantes do mundo, compreende ~ 60-70 espécies distribuídas inicialmente na Europa, Ásia, América do Norte e na América Central. Segundo o *The Plant List* o gênero *Vitis* inclui 68 espécies e são mantidas principalmente através do isolamento geográfico e, por sua pequena extensão. Quando em proximidade e com suficiente sobreposição no tempo de florescimento, as espécies de *Vitis* rapidamente hibridizam, uma característica muito explorada pelos melhoristas através do cultivo e domesticação da videira (Terral et al., 2009; Atak et al., 2011; Dangl et al., 2015).

O Brasil está entre os 20 maiores produtores de frutas do mundo, em 2019, e o décimo sexto na produção de uvas (FAOSTAT, 2020). O cultivo da videira destacou-se no agronegócio brasileiro com produção de 1,7 milhão de toneladas de uvas, onde 48,74% foram destinadas ao processamento e 51,26% ao comércio da fruta in natura (KIST et al., 2018a).

Nas últimas décadas observa-se um incentivo crescente, vindo da comunidade acadêmica e de órgãos ligados à saúde e alimentação, para o aumento do consumo de produtos vegetais. Conforme Spier et al. (2007), essa proposta de mudança de hábito alimentar é embasada e motivada por estudos que associam a ingestão de alimentos vegetais com a redução do risco de doenças crônico-degenerativas. Para Vinson et al. (2001), Pinto et al., (2021) e Al-Mamary et al., (2021) uma possível explicação do efeito protetor exercido pelos alimentos de origem vegetal contra diversas doenças, consiste no fato destes produtos serem ricos em substâncias antioxidantes (tocoferóis, carotenoides, fenólicos), que atuam prevenindo ou reparando danos celulares causados pelo estresse oxidativo. Neste contexto, os compostos fenólicos destacam-se pela pronunciada atividade antioxidante que apresentam e por estarem largamente distribuídos no reino vegetal, o que potencializa sua contribuição para a prevenção de doenças originadas por danos oxidativos. Ainda que os compostos fenólicos possam ser encontrados em diversos alimentos, é importante ressaltar que são as uvas e os produtos derivados do seu processamento estão entre as principais fontes alimentares (PEZZUTO, 2008; ROCKENBACH et al., 2011).

A uva é composta basicamente de açúcares solúveis (valores entre 43 - 72 g/100g dm), fibras alimentares (28% - 56%), ácidos orgânicos (1,09% - 14,33% C.V.I), pectinas (50,6 - 56,4 mg / equivalentes de ácido galacturônico), compostos aromáticos (90 -100 compostos), antocianinas (0,50 g/kg⁻¹ a 4,99 g/kg⁻¹), flavonoides (6 - 73 µg/g), ácidos fenólicos (0,46% - 12,40% C.V.) e resveratrol (50 - 100 µg/g), os quais estão distribuídos na casca, engaço, folhas e sementes, seu bagaço é um produto de alto valor nutricional, com possível aplicação como ingrediente funcional, suplemento ou

mesmo aditivo antioxidante, em substituição aos sintéticos (Ishimoto, 2008; Deng et al., 2011; Balík et al., 2013); Eydurán et al., 2015; Grimes et al., 2018; Wu et al., 2018). Pesquisas mostram os efeitos do extrato de semente de uva, como um potente antioxidante na memória espacial com a doença de Alzheimer e que poderia ser um agente útil a ocorrência de doenças crônico-degenerativas e também como efeito hipocolesterolêmico na prevenção e tratamento de aterosclerose de doença cardiovascular (Atak et al., 2011; Ribeiro, 2016).

De acordo com a literatura, a administração de fitoquímicos na dieta ou a possibilidade de aplicar agentes quimiopreventivos tem demonstrado atividade contra alergias, hipertensão, viroses, inflamações, artrites, mutações e carcinogênese (Oliveira, 2010; Maru et. al., 2016; Hamza et. al., 2018).

Nos dias atuais, milhares de pessoas no mundo são diagnosticadas com diversos tipos de câncer. Câncer é um grupo de doenças caracterizadas pelo crescimento e multiplicação de células anormais, e se não controladas, podem facilmente levar à morte. Dentre os tipos de câncer que acometem a população masculina mundial, o câncer de próstata (CaP) é o segundo mais incidente (INCA, 2017). O número de casos incidentes aumentou mais para câncer de próstata do que para qualquer outra malignidade, independentemente do status de desenvolvimento (Russo et al., 2017). Estudos realizados em animais demonstraram que os compostos fenólicos podem prevenir e/ou retardar a progressão da iniciação de diferentes tipos de câncer (Basli et al., 2016), entre eles o de próstata.(Singh et al., 2004; Darweesh et al., 2020). Apesar de eficazes, uma das principais limitações na prevenção de doenças é sua biodisponibilidade, entre os vários polifenóis e os mais abundantes em nossa dieta não são necessariamente aqueles que têm o melhor perfil de biodisponibilidade. Deve se dar ênfase a identificação e quantificação de metabólitos de polifenol com foco em sua atividade biológica (Lall et al., 2015). Assim, compreender os mecanismos pelos quais os vários nutrientes da dieta exercem sobre o câncer de próstata pode possibilitar o desenvolvimento de medicamentos eficazes para o seu tratamento e ainda promover mudanças nutricionais e de estilo de vida naqueles com risco de câncer de próstata (Willis et al., 2003).

Levando-se em consideração o atual crescimento do setor da vitivinicultura no Brasil, bem como, o presente trabalho visou identificar e elucidar a composição de compostos fenólicos do extrato de uva SJ na obtenção de extratos concentrados, bem como sua capacidade antioxidante e antiproliferativa em linhagens celulares de câncer de próstata. Os extratos obtidos poderão, ainda, apresentar impacto ambiental positivo, pela possibilidade de exploração por meio de possíveis medicamento ou suplemento biocompatível e com um apelo à alimentação saudável, bem como no tratamento do câncer de próstata.

2 Revisão de literatura

2.1.1 Câncer de próstata, tratamentos convencionais e possíveis novos tratamentos

A próstata é uma glândula do sistema reprodutor masculino se localiza na parte baixa do abdômen, a glândula não é grande tem aproximadamente um tamanho de uma noz. Ela está localizada logo abaixo da bexiga e à frente do reto (parte final do intestino grosso). A próstata envolve a porção inicial da uretra, o tubo que transporta a urina da bexiga para fora do corpo. A próstata produz parte do sêmen, líquido espesso que contém os espermatozoides, liberado durante o ato sexual. Isso significa que os problemas de próstata podem afetar a micção e a função sexual. Essa glândula sexual está sujeita a 3 condições: prostatite, hiperplasia benigna da próstata e câncer de próstata. A prostatite é uma infecção ou inflamação da próstata, a hiperplasia benigna da próstata está relacionada ao envelhecimento fazendo a próstata comprimir a uretra e no câncer ocorre o crescimento desordenado de células (carcinogênese) dentro da próstata podendo sair da glândula e afetar outras partes do corpo (metástase).

O câncer é considerado uma doença crônica em que células anormais se dividem incontrolavelmente com potencial de invadir e espalhar-se pelos tecidos e órgãos do corpo, sendo uma das principais causas de morte de homens no mundo, excedida apenas por doenças cardiovasculares no mundo desenvolvido. De acordo com estimativas mundiais em 2020, a Organização Mundial de Saúde divulgou um relatório sobre câncer a nível global mostrando a estimativa de câncer em 2018 havia cerca de 18,1 milhões de novos casos e 9,6 milhões de mortes por câncer e que em 2040 será de 29,4 milhões de novos casos. Nos homens a incidência do câncer de próstata equivale a 13,5% do total de novos casos (9 456 418 milhões) atrás apenas do câncer de pulmão (14,5%) (World Health Organization, 2020).

No Brasil, com dados de 2020 do INCA, a incidência de câncer entre os homens tem o câncer de próstata como o de maior incidência (29,2%), ou seja, é o segundo câncer que mais mata, em valores absolutos ao considerar ambos os sexos, é o segundo tipo mais comum e a partir de 65 anos (75%) dos casos no mundo.

Mais do que qualquer outro tipo, o CaP é considerado um câncer da terceira idade, ocorrendo principalmente em homens idosos. A idade é um fator de risco cuja relação com o CaP já está bem estabelecida. Cerca de 62% dos casos diagnosticados no mundo ocorrem em homens com 65 anos ou mais, sendo esperado um aumento de cerca de 60 % devido ao aumento da expectativa de vida mundial (INCA, 2015). Outro fator de risco considerado é a etnia. O CaP é aproximadamente duas vezes mais frequente em homens negros que em homens de outras raças (70% maior em afrodescendentes que em brancos) e são duas vezes mais propensos a morrer de CaP que homens brancos (REBBECK et al, 2013). Estudos genéticos sugerem que a predisposição familiar pode ser responsável por 5-10% dos casos. Ter um pai ou irmão com CaP, principalmente antes dos 60 anos, aumenta para mais que duas vezes a possibilidade do homem desenvolver a doença. O risco é maior para homens com vários parentes afetados, particularmente se seus parentes eram jovens quando o câncer foi encontrado (FITZGERALD et al, 2009; Sociedade Americana do Câncer, 2016). Outros fatores de risco são investigados quanto à relação com a doença, como mutações genéticas, dieta, obesidade, tabagismo, inflamações na próstata, infecções sexualmente transmissíveis e vasectomia (LEITZMANN; ROHRMANN, 2012).

A maioria dos cânceres de próstata tem origem nas células glandulares prostáticas, sendo chamados de adenocarcinoma. Alguns cânceres de próstata podem crescer e espalhar-se rapidamente para outros órgãos, mas a maioria cresce lentamente. No câncer pode ocorrer do tumor crescer de forma rápida, mas a maioria cresce de forma lenta levando cerca de 15 anos para atingir 1 cm³ sem dar sinais durante esse período (INCA, 2020; NIH, 2020; Harvard Health Publishing; 2019).

Segundo a IARC, 2020, o câncer de próstata tem subtipos tumorais histopatologicamente heterogêneos. Estes incluem neoplasias glandulares (adenocarcinoma acinar, carcinoma intraductal e adenocarcinoma ductal), carcinoma urotelial, carcinoma escamoso (carcinoma adeno escamoso e carcinoma de células escamosas), carcinoma basocelular e tumores neuroendócrinos (adenocarcinoma de células grandes e neuroendócrino, diferenciação de carcinoma neuroendócrino e grande carcinoma neuroendócrino celular). O mais comum desses subtipos de tumor é o adenocarcinoma acinar, que representa mais de 99% de todos os tumores de próstata.

Os primeiros sintomas podem ser desde disfunções do sistema urinário até sangramento, nos sintomas mais avançados a dor nas costas, quadris ou pelve até falta de ar, tontura ou pele pálida causada por anemia. Atualmente o diagnóstico é feito pela combinação de dois exames o nível de antígeno prostático específico (PSA) mais exame digital da próstata pelo reto, porém pode ser necessário demais exames como biópsia, ultrassonografia ou ressonância magnética transretal e tomografia computadorizada com isso demonstrando que os sintomas e diagnósticos variam e possuem subtipos, principalmente por não existir exames precisos ou um padrão ouro para câncer de próstata (INCa, 2020; NIH, 2020).

A ultrassonografia transretal é o método preferido para orientar a biópsia da próstata, na qual se obtém amostras de tecidos para análise histopatológica e definição do diagnóstico de CaP. Além de orientar o local da biópsia, a ultrassonografia transretal também é utilizada para acompanhar alterações no volume prostático, que é fator preditivo de detecção precoce de CaP, bem como avaliar a extensão local da doença (HOU et al., 2015; OCHIAI, 2017).

Uma vez detectado o tumor, o relatório anátomo patológico deve fornecer a graduação histológica do sistema Gleason, desenvolvido por Donald Gleason e colaboradores entre 1966 e 1974 (GLEASON; MELLINGER, 1974), que informa sobre o grau de agressividade do tumor, além de auxiliar na definição do melhor tratamento (HEINDERECH et al., 2014). Na graduação histológica, as células do câncer são comparadas às células prostáticas normais; quanto mais diferentes das células normais forem as células cancerosas, mais agressivo será o tumor e mais rápida será sua disseminação. A escala de graduação do sistema de Gleason baseia-se em padrões histológicos que variam de 1 a 5, com o grau 1 sendo a forma menos agressiva e o grau 5 representando o tumor anaplásico.

O grau 1 é caracterizado por apresentar células uniformes, pequenas e com formação de glândulas regulares, bem agrupadas e com bordos bem definidos. No grau 2, já pode-se perceber variação no tamanho e forma das células, agrupamento mais frouxo e bordos irregulares. As células no grau 3 variam ainda mais em tamanho e forma, com formação de glândulas muito pequenas, individualizadas e espalhadas pelo estroma.

No grau 4, muitas células estão constituindo massas amorfas ou formando glândulas irregulares, invadindo tecidos adjacentes. Quando classificado no grau 5, as células estão soltas ou se agrupando em massas amorfas, que invadem órgãos e tecidos vizinhos.

O tipo de tratamento depende do estágio da doença (Tabela 1) que também são classificados em estágios de I a IV com subcategorias. A escolha de qual estratégia de tratamento deve ser entre médico e paciente. Novos tratamentos têm sido testados com estudos e ensaios clínicos, o que ajuda a melhorar a forma como o câncer será tratado futuramente.

Tabela 1. Tipos de Tratamento de acordo com o estágio do câncer de próstata

Estágios da doença	Tipos de tratamentos				
Localizado	Observação vigilante	Cirurgia		Radioterapia	
Localmente avançado		Cirurgia	Tratamento hormonal	Radioterapia	
Recorrente ou resistente a hormônios				Radioterapia do emissor alfa	Quimioterapia Imunoterapia
Metástasico			Tratamento hormonal		
Ensaio clínico	Terapia fotodinâmica	Cirurgia	Terapia de ultrassom	Terapia por radiação por feixe de elétrons	Prostectomia radical

Fonte: Autora, 2021.

O número de casos incidentes aumentou mais para câncer de próstata do que para qualquer outra malignidade, independentemente do status de desenvolvimento (Russo et al., 2017). Estudos realizados em animais demonstraram que os componentes fenólicos podem prevenir e/ou retardar a progressão da iniciação de diferentes tipos de câncer (Basli et al., 2016). Uma das principais limitações na prevenção de doenças é sua biodisponibilidade, entre os vários polifenóis e os mais abundantes em nossa dieta não são necessariamente aqueles que têm o melhor perfil de biodisponibilidade. Deve se dar ênfase a identificação e quantificação de metabólitos de polifenol com foco em sua atividade biológica (LallA et al., 2015). Compreender os mecanismos pelos quais os vários nutrientes da dieta exercem seus efeitos sobre o câncer de próstata pode possibilitar o desenvolvimento de medicamentos

eficazes para o tratamento do câncer de próstata e promover melhores mudanças nutricionais e de estilo de vida naqueles com risco de câncer de próstata (Willis et al., 2003).

2.1.2 A uva

Segundo a Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) em 2019 o Brasil produziu em torno de 593 mil com isso sendo o 20º país na produção de frutas. No mesmo ano 91,5 milhões de toneladas de uva foram produzidas e entre os 20 maiores produtores temos da América Latina o Chile em 9º com 2,700 milhões de toneladas de uva e o Brasil no 16º com uma produção de 1,485 milhões de toneladas.

Um dado que chama a atenção é a produtividade média dos vinhedos brasileiros frente aos de outros países do mundo. Nos últimos anos, alguns países vêm se destacando em termos de produtividade média dessa fruta. O ranking da FAO (2014) mostra que Taiwan registra a maior produtividade média de uva, 35,4 toneladas/hectares. O Brasil figura em sétimo lugar, com rendimento médio de 18,3 toneladas/hectare (FAO, 2014). Vale lembrar que as videiras de cultivares voltadas para o consumo in natura (uva de mesa) registram maior produtividade do que videiras para uvas com destino industrial (suco ou vinho). Segundo autores que estudaram este assunto, a produtividade de um vinhedo destinado ao cultivo de uva de mesa tem sido de 15 a 25 toneladas/hectare, enquanto que a de uva de indústria (suco e vinho) vai de 5 a 15 toneladas/hectare (Araújo; Correia, 2008; Wutke, et al., 2011).

Conforme Giovannini (2008), a maior parte da produção nacional de suco é da chamada “uva comum” ou “americana”, pertencente à espécie *Vitis labrusca*. As uvas nomeadas de “finas” ou “europeias” são derivadas de videiras *Vitis vinifera*. Sabe-se que a espécie da uva é um dos fatores determinantes de sua composição química e assim, influencia diretamente atributos sensoriais do produto elaborado a partir delas.

As cultivares de *Vitis labrusca* embasam a produção de sucos no país. A utilização maciça dos produtos desta videira deve-se ao fato de fornecerem matéria-prima ideal para a produção de sucos, uma vez que estas uvas não perdem características aromáticas e gustativas mesmo quando o suco é submetido à pasteurização, mantendo sobretudo o aroma “foxado”, muito apreciado pela população das Américas. Além disso, as uvas

labruscas são mais produtivas e resistentes às doenças que comumente afetam essa fruta (Camargo; Maia; Nachtigal, 2005; Giovannini, 2008; Venturini-Filho, 2010).

Entretanto, com o surgimento de novos polos de viticultura nas regiões tropicais brasileiras, novas variedades de uva vinífera estão sendo empregadas na elaboração do suco. Segundo Sautter et al. (2005), do volume total de uvas destinadas ao processamento de sucos, cerca de 20% são uvas viníferas e 80% são uvas americanas. Venturini-Filho (2010) ressalta que os sucos de uvas viníferas, embora muito bem aceitos na Europa, possuem aroma menos marcantes que os sucos elaborados com uvas labruscas e híbridas.

A avaliação de novas cultivares de uva destinadas ao processamento em regiões de clima tropical e subtropical tornou-se imprescindível para a maior produção e qualidade de suco de uva. Os cultivares híbridos merecem atenção como uma fonte potencial de compostos fisiologicamente ativos, e podem ser de grande valor no futuro. Os híbridos com frutos escuros e sementes indicam maior conteúdo fenólico total e a atividade antioxidante, comparado com os híbridos sem sementes e de fruto escuro (Pedastsaar et al., 2014; Atak et al., 2017). As uvas *Vitis labrusca* e híbridas estão sendo absorvidas pelo mercado brasileiro, sendo as principais cultivares utilizadas para elaboração de vinho de mesa e suco no país, onde representam mais de 85% do volume de uvas industrializadas no País (Camargo et al., 2005).

A variedade de uva Sweet Jubilee (SJ), é uma variedade de uva melhorada que apresenta bagas grandes (20-25mm) de coloração preta possui sementes, alto rendimento, com textura firme e crocante, e bom tempo de armazenamento, e como detentora do registro da cultivar a empresa International Fruit Genetics (IFG). Sweet Jubilee® é um produto do programa de melhoramento da International Fruit Genetics sendo o cruzamento entre Red Globe e Summer Royal e foi apresentado em maio de 2001.

Em relação à sua composição nutricional, os macronutrientes de maior destaque nessa uva são os carboidratos, representados especialmente pela glicose e frutose. Conforme Gurak et al. (2010) e Rizzon e Link (2006), o conteúdo glicídico das uvas pode variar conforme a variedade, entretanto sempre haverá predominância dos açúcares redutores (glicose e frutose) sobre os açúcares não redutores (sacarose).

Assim como os açúcares, os ácidos orgânicos presentes no suco de uva também contribuem para sua qualidade sensorial, pois conferem um pH mais baixo à bebida e

asseguram um equilíbrio entre os gostos doce e ácido, de agradável palatabilidade (Gurak et al., 2010).

Sobre os ácidos orgânicos, cabe ressaltar que apesar de serem moléculas de baixo peso molecular, são capazes de influenciar diversas características sensoriais, como sabor, coloração e aroma. Além disso, podem contribuir para a estabilidade do suco e sua qualidade microbiológica (Mato; Suárez-Luque; Huidobro, 2007). Conforme Rizzon e Link (2006) e Mato, Suárez-Luque e Huidobro (2005), no suco de uva predominam os ácidos tartárico e málico, enquanto que os ácidos succínico e cítrico estão presentes em menores proporções.

A quantidade e a composição dos compostos fenólicos nas uvas podem variar de acordo com diferentes fatores, a saber: espécie da videira, variedade da uva, maturidade das bagas, condições climáticas, práticas de viticultura, região de cultivo, contato com insetos e microrganismos, exposição à luz ultravioleta e utilização de fertilizantes e pesticidas (Asami et al., 2003; Siriwoharn et al., 2004).

Os inúmeros fatores que condicionam a síntese de compostos fenólicos, bem como as diferentes vias pelas quais a síntese pode acontecer, justificam a heterogeneidade química deste grupo. Desta forma, Abe et al. (2007) relatam que os compostos fenólicos são normalmente divididos em dois grupos: flavonoides e não flavonoides. A biossíntese de flavonoides pela videira é extremamente influenciada pela luz solar recebida durante seu cultivo (Castillo-Muñoz et al., 2009). Makris, Kallithraka e Kefalas (2006) relatam que uvas mais expostas à luz solar e temperatura mais elevadas podem apresentar teores de flavonóis até dez vezes superiores do que os mesmos frutos cultivados em condições de sombreamento.

Ângelo e Jorge (2007) sugerem uma subdivisão do grupo dos flavonoides em mais seis classes, de acordo com o grau de hidrogenação e variações do anel C: flavonóis, flavanóis (ou catequinas), flavonas, flavanonas, antocianinas e isoflavonoides. Porém, em uvas, os flavonoides majoritários estão inseridos em três classes: flavonóis, flavanóis e antocianinas (Abe et al., 2007).

Na classe dos flavonóis, os principais constituintes estudados são: quercetina, miricetina e caempferol. Geralmente, nas variedades de *Vitis vinifera* predomina o caempferol e nas *Vitis labrusca*, a quercetina (Jackson, 1994). Além de estarem envolvidos

na definição da coloração de derivados da uva (pois atuam como co-pigmentos junto às antocianinas), os flavonóis são largamente estudados em função de sua atividade antioxidante, que confere um efeito protetor às diversas desordens patológicas (Iacopini et al., 2008; Nijveldt et al., 2001).

Nas uvas, os flavonóis geralmente encontram-se conjugados com glicosídeos e ocasionalmente na forma de agliconas. Os flavonoides de maior ocorrência em uvas possuem o glicosídeo ligado ao carbono 3, sendo que a glicose é o monossacarídeo mais encontrado, embora alguns flavonoides possam se associar a outros açúcares, como galactose, glicose, xilose e arabinose (Castillo-Muñoz et al., 2009; Makris; Kallithraka; Kefalas, 2006).

Na classe dos flavanóis, também denominados de flavan-3-óis, catequina e epicatequina são os principais compostos encontrados em sucos de uva. Estes estão presentes em abundância nas sementes e exercem influência sobre o sabor e adstringência (Abe et al., 2007).

Nos sucos de uva, os flavanóis encontram-se na forma monomérica de (+) catequinas e (-) epicatequinas, que pertencem ao grupo dos três polifenóis melhor absorvidos pelo organismo. Estudos *in vivo* demonstram a capacidade antioxidante dos flavanóis e uma associação positiva entre o consumo destas substâncias e a redução de doenças crônicas (Gollücke et al., 2008; Manach et al., 2005).

A terceira subclasse de flavonoides são as antocianinas, que estão amplamente distribuídas no reino vegetal, responsáveis pela pigmentação de flores e frutos, conferindo nuances arroxeadas, alaranjadas, azuladas e avermelhadas (Muñoz-Espada et al., 2004).

Em uvas, as antocianinas geralmente ocorrem como glicosídeos, uma vez que os açúcares conferem maior estabilidade à molécula. Podem estar associadas às moléculas de glicose, galactose, ramnose, xilose ou arabinose. Quando presentes na forma de agliconas, as antocianinas são denominadas de antocianidinas (Lee et al., 2008; Wang & Stoner, 2008). Existem relatos da existência de mais de 500 antocianinas e 23 antocianidinas, das quais cinco são encontradas em uvas: cianidina, delphinidina, malvidina, petunidina e peonidina (Castañeda-Ovando et al., 2009; Mullen et al., 2007; Wang & Stoner, 2008). Além de possuírem papel fundamental na coloração das uvas, as antocianinas são igualmente exaltadas por sua atividade antioxidante (Manach et al., 2005; Muñoz-Espada et al., 2004).

Estudos epidemiológicos realizados por Wang e Stoner (2008) e Speer et al., 2020, associam o consumo de antocianinas com a redução do risco de doenças cardiovasculares e neurológicas, diabetes e tratamento e prevenção de câncer.

Os estilbenos formam outra classe de compostos fenólicos não flavonoides, definidos como fitoalexinas de baixo peso molecular, sintetizados pela videira em resposta a condições de estresse fisiológico, como infecção microbiana, dano mecânico e radiação ultravioleta (Careri et al., 2003).

O resveratrol é o estilbeno mais extensivamente estudado quando se trata de uvas. Certamente isto acontece em virtude dos efeitos farmacológicos que o resveratrol promove, como: atividade anticarcinogênica, cardioprotetora e antioxidante. Sua síntese é influenciada por diversos fatores, sendo que maiores níveis de radiação ultravioleta são capazes de favorecer aumentos significativos (Gürbuz et al., 2007).

Assim, a uva é uma fruta que se destaca em relação aos compostos bioativos, como demonstrado por (Zeghad et al., 2019) nos ensaios de atividade antioxidante, compostos fenólicos, flavonóis e flavonoides entre a *Vitis vinifera*, *Punica granatum* (romã), *Citrus aurantium* (laranja) e *Opuntia ficus indica* (cacto – figueira da Índia). Os polifenóis têm variações na estrutura química e atividade e podem ser categorizados fundamentalmente em duas principais classes: flavonoides e não flavonoides. Os flavonoides, os polifenóis mais abundantes na uva, são distribuídos por toda a casca, semente e caule e incluem antocianinas, proantocianidinas (procianidinas e prodelfinidinas) e flavan-3-ols, em contraste, os ácidos hidroxicinâmicos, os não flavonoides mais abundantes no vinho, incluem o ácido cafárico e o ácido coutárico (Averilla et al., 2019).

Devido aos compostos fenólicos e antioxidantes a uva é uma fonte natural potencial de substâncias bioativas, além da atividade antioxidante, os flavonoides também podem apresentar propriedades protetivas. Como os antioxidantes representam um grupo grande e diverso de substâncias que atuam em princípios diferentes; portanto, a metodologia e as possibilidades de sua determinação são frequentemente complexas.

A busca por compostos bioativos a partir de fontes vegetais, inclusive resíduos agroindustriais, tem sido impulsionada pela pesquisa científica destas moléculas específicas contra uma vasta gama de doenças. De acordo com Silva et al. (2016), a incorporação de aditivos alimentares de fontes naturais tornou-se uma das mais importantes tendências

na indústria de alimentos, devido às evidências que correlacionam a dieta e as doenças crônicas com a aplicação de aditivos químicos sintéticos nos alimentos ingeridos.

2.1.3 Produtos naturais, compostos bioativos de frutas e câncer

A medicina “não branca” conhecida como medicina tradicional em todo o mundo tem a sua base o tratamento com o uso de ervas para diversas enfermidades (Alves-Silva et al., 2017; Ma et al., 2017; Tariq et al., 2017). Produtos naturais e suas estruturas desempenham um papel significativo no processo de pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos.

Entre 1981 e 2019 medicamentos antitumorais contabilizam 185 pequenas moléculas sendo que 62, ou 33,5%, são derivados de produto natural ou produto natural inalterado ao adicionar as 52 macromoléculas biológicas soma o total de 237 medicamentos anticâncer em quase 38 anos (48%) (Newman & Cragg, 2020). Segundo Bernardini et al. (2018), as pesquisas de novos medicamentos estarão voltadas no futuro para o desenvolvimento de medicamentos à base de misturas naturais, pelos possíveis efeitos sinérgicos, redução de efeitos colaterais e redução de custos. Por serem amigáveis ao organismo essas pequenas moléculas como os metabólicos secundários nas plantas são classificadas com base na via que são sintetizadas sendo 3 grupos principais: terpenóides, fenólicos e alcalóides. No entanto, além de existirem compostos naturais com atividade antitumoral se tem a possibilidade da modificação estrutural de produtos naturais para a descoberta de novos medicamentos com aqueles compostos ditos promissores, mas que não possuem biodisponibilidade. (Seca & Pinto, 2018). O consumo de frutas, vegetais e plantas muito utilizadas na medicina tradicional pode conter propriedades anticâncer pela presença dos compostos bioativos e que apesar de estar disponível em pequenas quantidades é um extra-nutriente que também possui mecanismos complementares entre si e que pode funcionar como elementos de prevenção ao câncer ou no auxílio ao tratamento quimioterápico (Vanamala, 2017)

O kaempferol do grupo dos flavonóis exibe muitas propriedades anticâncer e os seus derivados isolados da lentilha (*Lens culinaris* Medik.) podem ser úteis na proteção de células normais contra danos ao DNA causados por quimioterápicos e aumentar o efeito do quimioterápico contra as células HL-60 (leucemia promielocítica humana) e com isso dano ao DNA (Kluska et al., 2019). Outro composto bioativo, o fitol, um terpenóide disponível em

sementes de melancia (*Citrullus lanatus*) inibiu o crescimento da célula Jurkat (linhagem de leucemia de linfócitos T) com a parada do ciclo celular na fase S e inibiu a progressão do tumor de adenocarcinoma de pulmão com resultado semelhante ao quimioterápico (Itoh et al., 2018). A semente de manga (*Magnifera indica L.*) que contém quantidades significativas de polifenóis inibiu a proliferação celular da linhagem HeLa e a literatura demonstra que a folha, casca e caule também possuem atividade antitumoral (Timsina & Nadumane, 2015).

A framboesa preta modula genes envolvidos nos estágios finais da tumorigênese esofágica, revertendo ou reduzindo o número de lesões pré-neoplásicas (Wang et al., 2011). Assim como a framboesa o mirtilo também é rico em flavonoides e sua ingestão oral em pó diminuiu o crescimento do tumor de câncer de mama por meio da modulação de via de sinalização na mediação dos processos de inflamação e sinalização celular (Adams et al., 2011). Outros frutos silvestres como o mirtilo (*Vaccinium myrtillus*), e outra espécie de mirtilo (*Vaccinium vitis-idaea*) e a amora (*Rubus chamaemorus*), que são ricos em antocianinas, proantocianidinas e ácido elágico, respectivamente mostraram ser fonte de componentes quimiopreventivos contra a tumorigênese intestinal (Misikangas et al., 2007).

Um fruto da Ásia oriental, a lichia (*Litchi chinensis* Sonn.) utilizada na medicina tradicional chinesa, tem como seus principais compostos bioativos antocianinas e flavonóis em seu pericarpo e tem potencial atividade anticâncer contra o carcinoma hepatocelular *in vitro* e *in vivo* e o câncer de mama humano (Zhu et al., 2019). Outro fruto oriental, o mangostão (*Garcinia mangostana*) demonstrou com o seu principal metabólito secundário uma xantona chamada γ -Mangostina a inibição da proliferação celular e da formação de colônias nas células do câncer de cólon e suprimiu significativamente o crescimento do tumor (Krishnamachary et al., 2019). Extraído do damasco japonês (*Prunus mume*), o MK615 é um composto que contém vários triterpenóides, como o ácido oleanólico e o ácido ursólico é um alimento tradicional do leste asiático e tem seu extrato MK615 como inibidor do crescimento de células de melanoma e é eficaz no tratamento de carcinoma hepatocelular avançado (Hoshino et al., 2013; Tada et al., 2012).

A tangerina (*Citrus reticulata* Blanco) e a pinha (*Annona squamosa*) mostraram resultados no controle do crescimento celular no câncer. O uso da folha da pinha inibiu a proliferação celular no câncer de cólon, com a tangerina o uso do extrato do flavedo, a parte

mais externa da casca, mostraram efeitos significativos de citotoxicidade em linhagens de células tumorais gástricas (Al-Nemari et al., 2020; Y. Wang et al., 2017).

Dos frutos híbridos, o fruto arônia também chamado de Chokeberry teve o seu híbrido *Aronia prunifolia* com mais antioxidante que o fruto não híbrido *Aronia melanocarpa* e *Aronia arbutifolia*, e também *A. prunifolia* demonstrou uma inibição gradativa na proliferação de células tumorais após 48 h de tratamento, mostrando-se citotóxico para células HeLa (Rugină et al., 2012). Em outro estudo, uma cultura de suspensão celular eficiente foi estabelecida com calos friáveis derivados de folhas de morango híbrido micropropagado (*Fragaria x ananassa Duch*), cv. Don, como pré-requisito para estudos *in vitro* da produção de metabólitos bioativos, os extratos dessas culturas em suspensão de células *in vitro* induziram uma redução estatisticamente significativa da proliferação em neuroblastoma humano (IMR-32, SH-SY5Y), adenocarcinoma colorretal (Caco-2), adenocarcinoma de cólon (HT-29) e linhas celulares de carcinoma do colo do útero (Hep-2) (Lucioli et al., 2019). Quatro híbridos de *Malus sieversii* (maçã de polpa vermelha) foram comparados com maçã Fuji e mostraram maior quantidade de compostos fenólicos e flavonoides, sendo os híbridos “A38” e o “Meihong” de polpa vermelha com maior atividade antioxidante e antiproliferativa no câncer de mama humano nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 (Li et al., 2020). Ainda sobre flavonoides, o extrato da folha de atemoia (*Annona atemoya*) um híbrido de pinha (*Annona squamosa*) e chirimoia (*Annona cherimola*) teve o metabólito rutina identificado na regulação do efeito inibitório na doença de Alzheimer ao evitar a agregação da β -amilóide e morte celular neuronal (Lim et al., 2019). O último híbrido aqui citado, a toranja uma fruta cítrica que é o resultado do cruzamento do pomelo com a laranja tem seu metabólito secundário o nootkatone testado no adenocarcinoma de pulmão com resultados na inibição da progressão do câncer via ciclooxigenase (COX-2) e consequentemente a inibição do crescimento celular e a diminuição da proliferação celular pela ativação da AMPK (proteína quinase ativada por AMP) (Hung et al., 2019).

Apenas 5-10% dos cânceres são atribuíveis a alterações hereditárias nos genes e diversas formas de câncer se tornaram algumas das principais causas de mortalidade no mundo, levando à pesquisa e ao desenvolvimento de novos medicamentos anticâncer, combinações de medicamentos e estratégias de quimioterapia por meio da exploração

sistemática e metódica do produto sintético e natural (Timsina & Nadumane, 2015; Vanamala, 2017).

Frutas e vegetais, que constituem elementos importantes da dieta humana, são uma rica fonte de compostos, como polifenóis, flavonoides e carotenóides. Então buscam-se compostos que protejam as células normais contra os efeitos tóxicos dos antineoplásicos ou funcionem como quimioterápicos. Com o desenvolvimento da biotecnologia, as abordagens da genética molecular podem melhorar muito os níveis de compostos bioativos por meio do cruzamento seletivo de novos cultivares, pois uma única planta pode conter muitos metabólitos secundários, os compostos bioativos, e em quantidades substanciais desses constituintes podem ser responsáveis por diferentes bioatividades. Além disso, na fitociência, a identificação dos compostos bioativos e suas atividades biológicas ajudarão a elucidar a toxicidade e efeitos colaterais, calcular as dosagens adequadas e encontrar o melhor método para extraí-los. (Al-Nemari et al., 2020; Kluska et al., 2019; Zhu et al., 2019).

3 Objetivo

3.1.1 Geral

- Obter extratos, Caracterizar e determinar a influência dos extratos de uva *Sweet Jubilee* em linhagens celulares de câncer de próstata humano.

3.1.2 Específicos

- Determinar a atividade antioxidante e compostos fenólicos dos extratos de uva *Sweet Jubilee*;
- Caracterizar os compostos bioativos dos extratos uva *Sweet Jubilee*;
- Avaliar o efeito do extrato de uva *Sweet Jubilee* em função do tempo de incubação e da concentração, sobre a viabilidade celular de linhagens celular de próstata;
- Avaliar os efeitos dos extratos de uva *Sweet Jubilee* sobre o ciclo celular e apoptose em cultura de células das linhagens celular de câncer de próstata.

4 Material e Métodos

4.1.1 Amostra

Amostras da uva *Sweet Jubilee* foram doadas pela Fazenda Labrunier localizada em Petrolina (Pernambuco, Brasil) e transportadas sob refrigeração ao Núcleo de Bioquímica Nutricional da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro.

As amostras liofilizadas da uva integral foram extraídas para análise físico-química por meio de 6 soluções extratoras: metanol (MOH), metanol 50% (MOH50), sequencial de metanol 50% e acetona 70% (SQ), Acetona 70% (A70) água 100% (H2O) e etanol 80% (EOH80) em 50 mg/mL. Foram homogeneizadas por 10 minutos (TE-420, Tecnal, São Paulo, Brasil) e após a diluição com as soluções, as mesmas foram submetidas a banho de ultrassom por 30 minutos (DGT 100 Plus Provecto Analytic, São Paulo, Brasil) e a centrifugação por 5 minutos a 5000 rpm (Thermo Fisher Scientific, Bartlesville, CA, USA) em seguida o extrato obtido foi filtrado em papel de filtro Whatman number 1.

4.1.2 Determinação de atividade antioxidante e compostos fenólicos

A análise da atividade antioxidante foi realizada por 4 métodos distintos, pela medida da atividade de redução do radical DPPH, pelo método de ABTS, FRAP e ORAC. A estimativa do teor de compostos fenólicos totais foi realizada pelo ensaio Folin-Ciocalteu.

4.1.2.1 *Atividade sequestrante do radical DPPH*

O DPPH é um radical livre estável que aceita um elétron ou um radical de hidrogênio para tornar-se uma molécula diamagnética estável e desta forma, é reduzido na presença de um antioxidante. A atividade antioxidante dos extratos de uva em relação ao radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil) foi quantificada por meio de um protocolo descrito por Rufino et al., 2007, utilizando espectrofotômetro (Sequoia -Turner® modelo 340, Haverhill, MA, EUA) com a leitura da absorbância a 515 nm em 30 min de reação. A solução de trabalho foi obtida dissolvendo 2,4 mg de reagente DPPH com 100 mL de metanol e armazenada no escuro para estabilização da solução. A alíquota (50 µL) do extrato reagiu com 2,5 mL da solução de DPPH por 30 min no escuro. Uma curva padrão foi preparada, utilizando Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico). A atividade antioxidante foi calculada em

comparação com o efeito do antioxidante comercial Trolox e é expressa em mMol de equivalente de Trolox (TEAC) / g de amostra. A atividade antioxidante foi expressa de acordo com a equação: %AA = 100 - $\{[(\text{Abs amostra} - \text{Abs branco}) \times 100] / \text{Abs controle}\}$

4.1.2.2 Atividade antioxidante pela captura do radical ABTS

Para o ensaio ABTS, o procedimento seguiu o método de Rufino, et al., 2007. Este método é baseado na parada do radical ABTS (2,2 Azinobis (3-etil-benzotiazolina-6-sulfonato)), onde 5 mL do radical ABTS foi formado por oxidação de 88 µL de K₂S₂O₈ durante 16 h para a formação do radical ABTS^{•+}, uma reação química com persulfato de potássio em uma relação estequiométrica de 1: 0,5 e uma vez formado, o radical ABTS^{•+} é diluído em etanol até obter uma medida de absorvância de 0,70 (± 0,02). Em seguida 2,5 mL foram adicionados a cada alíquotas de 10, 20 e 30 µL. O Trolox foi usado para traçar uma curva padrão. As alíquotas permaneceram por 6 min e foram lidas em uma absorvância de 734 nm em espectrofotômetro (Sequoia-Turner® modelo 340, Haverhill, MA, EUA). A capacidade antioxidante equivalente de Trolox (TEAC) foi expressa em mMol TE / g de amostra.

4.1.2.3 Atividade antioxidante pela redução do ferro - FRAP

O método FRAP é baseado na capacidade de reduzir Fe (III) a Fe (II) em meio ácido (Rufino et al., 2006) esta redução tem início com a presença do antioxidante da amostra. O reagente FRAP é composto por solução de FeCl₃, solução de TPTZ (2,4,6-Tri (2-piridil) -s-triazina) em HCl 40 mM e tampão acetato (pH 3,6). A solução de trabalho fresca foi preparada pela mistura de 25 mL de tampão de acetato, 2,5 mL de solução de TPTZ e 2,5 mL de solução de cloreto férrico. Os extratos (20, 45 e 90 µL) foram deixados reagir com 2,7 mL da solução FRAP. O sulfato ferroso foi usado para fazer uma curva padrão. Após 30 min de reação em banho quente, a leitura foi realizada em 595 nm em espectrofotômetro (Sequoia-Turner® modelo 340, Haverhill, MA, EUA). Os resultados são expressos em µMol de Equivalente de Sulfato Ferroso (FeSO₄) / g de amostra.

4.1.2.4 Capacidade de absorção do radical de oxigênio - ORAC

O método de ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) mede a capacidade do antioxidante em sequestrar radicais peroxil que são gerados por uma fonte radicalar, AAPH

(2,2'-azobis(2-amidinopropano) dihidroclorado), a 37°C. O radical peroxil, gerado pela reação do com oxigênio atmosférico, reage com o indicador fluorescente para formar um produto não fluorescente, que pode ser medido por espectrofotometria com máxima emissão de fluorescência. Este ensaio avalia a atividade antioxidante através da inibição da oxidação, induzida pelo radical peroxil, por transferência de átomos de hidrogênio. Os ensaios foram realizados usando um leitor de placas automatizado (SpectraMax i3x) com microplaca de 96 poços (Prior et al., 2003) com base na capacidade dos compostos antioxidantes em capturar o radical peroxil. As análises foram conduzidas em tampão fosfato pH 7,4 a 37°C. Um radical peroxil foi gerado usando dicloridrato de 2,20-azobis (2-amidino-propano), preparado de fresco para cada corrida. Fluoresceína foi usada como substrato. Na microplaca foram feitos 20 µL de 8 concentrações de cada amostra com tampão PBS (pH 7,4). 120 µL de fluoresceína foram adicionados e usados como substrato. A geração do radical peroxil foi induzida pela adição de 60 µL de dicloridrato de AAPH. Um controle sem AAPH, um branco com apenas tampão e uma curva Trolox padrão foram preparados. A microplaca foi incubada por 3 h a 37°C e lida a cada 5 min no fluorímetro (SpectraMax i3, Molecular Devices, EUA) sob excitação a 485 nm e emissão a 535 nm. A captação do radical causa uma diminuição na emissão de fluorescência. A área sob a curva (AUC) do decaimento de fluorescência foi calculada e a AUC em branco foi subtraída da AUC das amostras. A atividade antioxidante foi determinada por comparação com a curva Trolox padrão e expressa em mMol TE/g de amostra.

4.1.2.5 Compostos fenólicos totais

O método espectrofotométrico baseado no reagente de Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965) é geralmente usado para medir o conteúdo de compostos fenólicos totais. Mas é baseado na capacidade de redução dos compostos, portanto, pode ser usado como um ensaio antioxidante. A determinação foi realizada adicionando 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu 10% à alíquota de 250 µL de cada extrato de uva. Após 5 minutos, foram adicionados 2 mL de carbonato de sódio a 4%. O ácido gálico 0,1% foi usado para fazer uma curva padrão. As amostras permaneceram por 2 h no escuro e a absorbância foi medida em um espectrofotômetro (Sequoia-Turner® modelo 340, Haverhill, MA, EUA) a 760 nm. Os resultados foram expressos em mg de equivalente de ácido gálico (GAE) / g de amostra.

4.1.3 Ensaio *in vitro*

O cultivo celular e ensaio de viabilidade celular foram realizados no Instituto Nacional do Câncer (INCA). As linhagens celulares PC-3 e DU-145, de câncer de próstata humana com metástase em osso e cérebro respectivamente, foram cultivadas em frascos para cultura e placas de 4 poços, em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), e 1% de anfotericina mais 1% de penicilina/estreptomicina e uso do tampão PBS, com pH 7,4, sob atmosfera com 5% CO₂ a 37°C. As células com confluência de 70-80%, passaram por tripsinização cerca de duas vezes por semana. A amostra liofilizada da uva foi diluída no meio de cultura na proporção de 20mg/mL.

4.1.3.1 Ensaio de viabilidade celular – MTT

Conforme descrito por Mosmann (1983), a viabilidade celular é determinada pelo ensaio MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil- tetrazólio - Amresco,USA). Foram plaqueadas $2,0 \times 10^4$ células/poço em placas de 96 poços que posteriormente foram incubadas com 7 diferentes concentrações da uva. Após 24, 48 e 72 horas de tratamento, foi adicionado 10 µL/poço de solução de MTT foram adicionadas a cada poço e após 4 horas de incubação, 50 µL/poço de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados para solubilizar o formazan gerado. Por fim, as amostras foram lidas no leitor de ELISA (Bio-Rad iMARK e software Softmax 4.3 Ls) a 570 nm. E calculada a taxa de inibição da proliferação celular. A taxa de inibição da proliferação celular (CPIR) foi expressa como uma porcentagem e calculada usando a seguinte fórmula: $CPIR = 100 - (\text{valor médio do grupo experimental} - \text{valor médio do grupo controle}) \times 100 / \text{valor médio do grupo controle}$.

4.1.3.2 Ensaio de ciclo celular

As células de câncer de próstata foram incubadas por 48h na presença e na ausência da amostra em 2 concentrações (1000 µg/mL e 5000 µg/mL) e foram tripsinizadas em temperatura ambiente em seguida as células foram ressuspendidas em 500 µL de solução fria de Vindelov (Vindelov, 1977), contendo 0.1% Triton X-100, 0.1% RNase e 50 µg / mL iodeto de propídio (Sigma). As células foram analisadas quanto ao conteúdo de DNA por um citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson, Mountain View, CA, EUA) com leitura de

30000 células para cada replicação (Pozarowski & Darzynkiewicz, 2004). Células com conteúdo de DNA menor que G1 na distribuição do ciclo celular foram consideradas células hipodiplóides (subfase G1). As proporções relativas de células com apoptose (<2n), diplóide G0 / G1 (2n), S (> 2n, mas <4n) e G2 / M (4n) indicativo de conteúdo de DNA foram adquiridas usando software Cell Quest iPro. A porcentagem da população de células em cada fase específica foi estimada com o software FlowJo v 10.0.6 e comparada ao controle.

4.1.3.3 Ensaio de apoptose

O tipo de morte celular é analisado pelo ensaio de externalização de fosfatidilserina (van Engeland et al., 1998). Células de adenocarcinoma de próstata foram incubadas em microplaca de 6 poços utilizando $5,0 \times 10^5$ células/poço com 2 concentrações da amostra por 48 h. As células foram suspendidas usando uma solução de Tripsina e, em seguida, submetidas à marcação com 500 μ L de solução tampão a 10% do kit II de detecção de apoptose (BD Pharmigen, San Diego, EUA), 5 μ L de anexina V FITC e 5 μ L de iodeto de propídio por 15 minutos em temperatura ambiente. A detecção foi feita por citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson, Mountain View, CA, EUA), utilizando o software Cell Quest iPro, contando 30000 células e que foram reconhecidas por suas propriedades de dispersão direta (FSC) / dispersão lateral (SSC). A fluorescência do isotiocianato de fluoresceína (FITC) verde foi medida a 530 ± 30 nm (detector FL1) e a fluorescência do vermelho do iodeto de propídio foi medida a 585 ± 42 nm (FL2). A porcentagem de células viáveis e as células em apoptose precoce ou tardia ou morte não apoptótica foi calculada usando o software FlowJo v 10.0.6.

4.1.4 Caracterização do perfil fitoquímico por UPLC-MS^E

Na caracterização dos compostos fenólicos presentes na uva SJ foram utilizadas 2 amostras, uma amostra integral e outra amostra com apenas a polpa e, para essas amostras, foram utilizados dois extratores distintos, água e acetona. Os extratos foram pesados (1 g) e os compostos foram extraídos com solução de metanol no banho de ultrassom com posterior centrifugação.

Para a análise de UPLC-MS^E, as soluções extratoras foram evaporadas usando uma centrífuga evaporadora a vácuo (SpeedVac, Savant, Thermo Scientific) a 40 °C e então as

amostras foram dissolvidas em metanol/acetoneitrila/água (2:5:93; v/v). Soluções estoque de 11 padrões (ácido cafeico, (+)-catequina, ácido elágico, (-)-epicatequina, ácido gálico, ácido gentísico, ácido 4-hidroxibenzoico, miricetina, pirogalol, quecetina e 3-O-glucosídeo de quercetina) da Sigma-Aldrich (St-Louis, Missouri, EUA) foram preparadas individualmente a 500 ppm solução de metanol. Uma alíquota de cada padrão foi adicionada para obter a mistura de padrões em uma concentração final de 10 ppm. Por fim, extratos e padrões foram filtrados em um filtro de seringa de 0,22 μm e armazenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento da análise UPLC-MS.

Para análises UPLC-MS^E, 2 μl de extratos e padrões foram injetados em triplicata em um sistema cromatográfico Acquity UPLC (Waters, Milford, MA) acoplado ao espectrômetro de massas Xevo G2-S QTOF-MS / MS (Waters, Manchester, Reino Unido) equipado com uma fonte de ionização do tipo electrospray, (ESI) operando no modo de ionização negativo de acordo com Santos et al. (2019). A coluna utilizada foi UPLC HSS T3 C18 (100 mm x 2,1 mm, 1,8 μm) (Waters, Irlanda). A coluna e o amostrador automático foram mantidos a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $8\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectivamente. A vazão foi de 0,6 mL /min e utilizando como fase móvel água contendo formiato de amônio 5 mM e 0,3% ácido fórmico, v/v) (bomba A) e acetoneitrila contendo 0,3% de ácido fórmico (bomba B), de acordo com o seguinte gradiente de eluição: 97% A a 0 min, 50% A a 6,8 min, 15% A a 7,4-8,5 min, seguido por um passo de equilíbrio adicional 97% A a 9,1-12 min. Os dados foram adquiridos usando o método de aquisição MS/MS do tipo multiplexo alternando a aplicação de energia baixa e de alta colisão (MS^E) no modo centróide coletando dados de m/z entre 50-1000. A tensão no capilar e no cone foram ajustadas em 3,0 kV e 30 V, respectivamente. O gás de dessolvatação (N_2) foi regulado para 600 L/h a $450\text{ }^{\circ}\text{C}$, a vazão do gás no cone foi regulada para 50 L/h e a temperatura da fonte a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$. Experimentos MS^E foram realizados utilizando uma rampa de energia de colisão variando de 30-55 eV usando argônio puro (Ar). A aquisição de dados foi realizada utilizando MassLynx 4.1 (Waters Corporation, Milford, MA). Para garantir precisão e reprodutibilidade, todas as aquisições foram realizadas utilizando a infusão simultânea do agente calibrante (lock mass) leucina-encefalina (Waters Corporation, EUA) (m/z 554.2615) em uma concentração de 1,0 ng/L em acetoneitrila: H₂O (50:50, v/v) com 0,1% (v/v) de ácido fórmico a 10 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Os dados brutos das triplicatas foram processados com Progenesis Q1 v2.1 (Nonlinear Dynamics, Waters Corporation, Reino Unido) com as seguintes condições: dados em centroide, resolução (FWHM) a 50.000 e modo negativo [M-H]⁻. A identificação dos compostos fenólicos foi realizada através da pesquisa de compostos polifenóis utilizando um banco de dados customizado obtido na base de dados PubChem, utilizando os seguintes parâmetros: erro de massa do íon precursor e de fragmentos (5 e 10 ppm, respectivamente), tempo de retenção 7,5 min, espectros de MS-MS e score de fragmentação, similaridade isotópica (>80). Os dados processados foram exportados para o software Ezinfo v 3.0.3 (Umetrics, Sweden) da Waters usando uma escala de pareto(van den Berg et al., 2006) onde foi elaborada a Análise de Componentes Principais (ACP) e o Heatmap no software online MetaboAnalyst (<https://www.metaboanalyst.ca/>).

4.1.5 Análise estatística

Os dados dos experimentos foram apresentados como médias \pm desvio padrão de dois ou três experimentos independentes feitos em triplicata (n=3). Os dados experimentais obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas através do pós-teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa GraphPad Prism 5.0.

5 Resultados

5.1.1 Compostos fenólicos e atividade antioxidante

No ensaio de compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu utilizou-se seis soluções extratoras diferentes para verificar a melhor relação solvente/extrator e sugerir qual o potencial de compostos fenólicos presentes na uva (Tabela 2). O extrato SQ e A70 não tiveram diferença estatística entre si ($p < 0,05$) e indicaram resultados superiores aos extratos biocompatíveis de H₂O e EOH80. Estes últimos também não tiveram diferença entre si ($p > 0,05$), assim como os extratos de MOH50 e MOH.

Tabela 2. Compostos Fenolicos Totais (mg GAE/g) em extratos de uva SJ

Soluções extratoras de compostos de uva SJ	Compostos Fenolicos Totais (mg GAE/g)
H2O	1047,21 ± 63,30 ^a
MOH50	1575,69 ± 87,69 ^b
MOH	1630,84 ± 129,61 ^b
EOH80	1128,42 ± 125,39 ^a
A70	2014,48 ± 17,28 ^c
SQ	2035,09 ± 3,63 ^c

Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa. Os resultados foram comparados pelo teste one-way anova, com pós-teste Tukey ($p < 0,05$.)

Foram utilizados quatro métodos, um direto com o ensaio de ORAC e três indiretos com o DPPH, ABTS e FRAP para os experimentos in vitro da atividade antioxidante. Eles diferem na forma de quantificar a atividade antioxidante, que podem ser baseados na recepção de íons H⁺ ou na reação redutora (Tabela 3).

Como resultado do método de DPPH, a capacidade de redução do radical apresentado pelo extrato de MOH, MOH50, SQ e A70 não obtiveram resultados com diferença estatística ($p < 0,05$). E entre os extratos de H₂O e EOH80, os valores percentuais

não apresentaram diferença estatística. Então pode se afirmar que ocorreu uma variação entre 67,16% e 90,42% no teor de DPPH.

Tabela 3. Capacidade antioxidante do extrato de uva SJ por diferentes métodos

Soluções extratoras de compostos de uva SJ	DPPH (%)	ABTS ($\mu\text{mol ET/g}$)	FRAP ($\mu\text{mol SFE/g}$)	ORAC ($\mu\text{mol ET/g}$)
H2O	68,53 ^a	614644,46 \pm 53697,75 ^a	129691,57 \pm 3411,28 ^a	131,61 \pm 20,96 ^a
MOH	88,05 ^b	605600,96 \pm 6579,58 ^a	169441,29 \pm 19496,62 ^a	185,32 \pm 59,72 ^a
MOH50	82,96 ^b	606421,91 \pm 26961,13 ^a	149860,12 \pm 10283,83 ^a	259,87 \pm 48,54 ^a
A70	89,92 ^b	648153,78 \pm 35704,49 ^a	93673,08 \pm 2876,11 ^b	757,00 \pm 48,03 ^b
SQ	90,42 ^b	646252,93 \pm 41143,53 ^a	63120,63 \pm 5582,96 ^b	203,17 \pm 75,33 ^a
EOH80	67,16 ^a	743851,27 \pm 78475,88 ^a	152376,31 \pm 11939,22 ^a	667,99 \pm 191,71 ^b

Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa. Os resultados foram comparados pelo teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os dados obtidos com o radical ABTS mostrados na tabela 3 não possuem diferença significativa ($p < 0,05$) quanto ao uso de um dos seis solventes para este ensaio.

A atividade antioxidante pela redução do ferro, apresentado pelos extratos de H2O, MOH, MOH50 e EOH80 não obtiveram resultados com diferenças estatísticas entre si ($p < 0,05$). E entre os extratos de A70 e SQ os dados não apresentaram diferença estatística. Por isso pode se afirmar que o ensaio trouxe uma variação de dados entre 63120,63 \pm 5582,96 $\mu\text{mol SFE/g}$ e 169441,29 \pm 19496,62 $\mu\text{mol SFE/g}$.

No ensaio de ORAC, o extrato A70 e EOH80 com respectivos valores 757,00 \pm 48,03 $\mu\text{mol ET/g}$ e 667,99 \pm 191,71 $\mu\text{mol ET/g}$ demonstraram diferença estatística ($p < 0,05$) com os demais extratos. No entanto, entre os dois extratores A70 e EOH80 não há diferença estatística.

5.1.2 Efeito citotóxico do extrato da *Sweet Jubilee*

Através da avaliação de viabilidade celular com o ensaio de MTT foi possível analisar o efeito citotóxico da *Sweet Jubilee* como mostrado nas figuras 1 e 2 referentes à linhagem DU145 e figura 3 para a linhagem PC-3 nos tempos de incubação de 24h, 48h e 72h. O período de 72 h foi descontinuado por não apresentar efeito citotóxico.

Foram utilizadas as concentrações de 10-5000 $\mu\text{g/mL}$ da uva liofilizada em meio de cultura para o tratamento das duas linhagens. Para a DU145 no tempo de 24h as maiores

concentrações de 5000, 2500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ demonstraram resultados na diminuição da viabilidade com suas respectivas porcentagens de 26,14%, 23,31% seguido de 33,99%, e no tempo de 48h de tratamento com resultados de 46,66%, 34,01% e 39,81% comparadas ao controle.

Com a linhagem PC-3, foi possível observar também a diminuição da viabilidade celular nas mesmas concentrações com resultado 48,79%, 40,45%, 31,51%, porém no tempo de 24h esta linhagem se manteve viável.

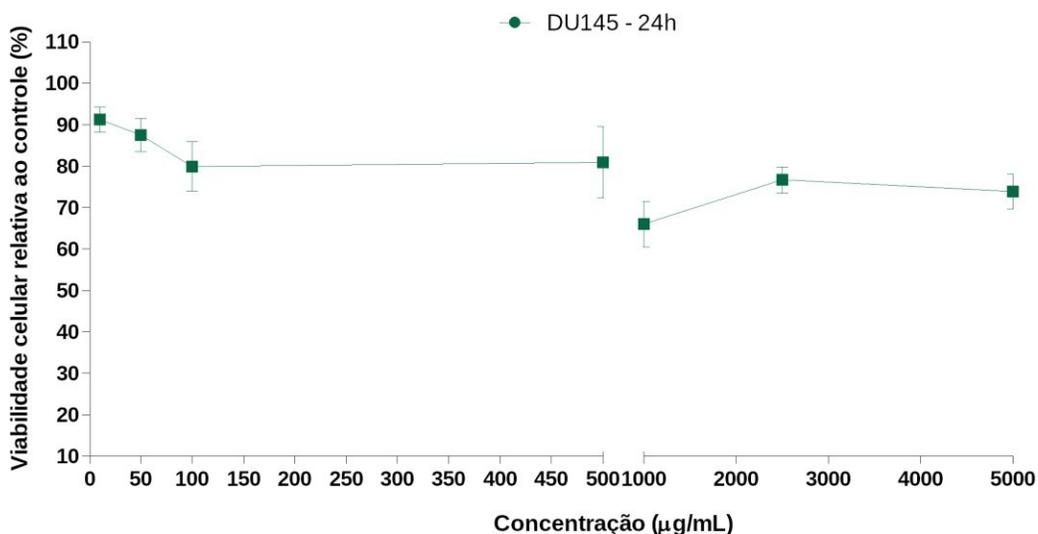


Figura 1. Percentual de inibição da viabilidade relativo ao controle de DU145 após 24h de tratamento

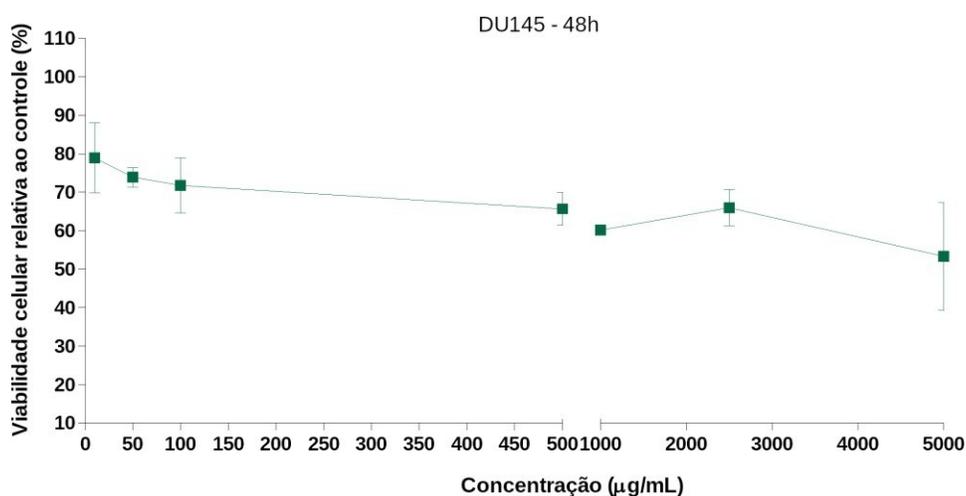


Figura 2. Percentual de inibição da viabilidade relativo ao controle de DU145 após 48h de tratamento

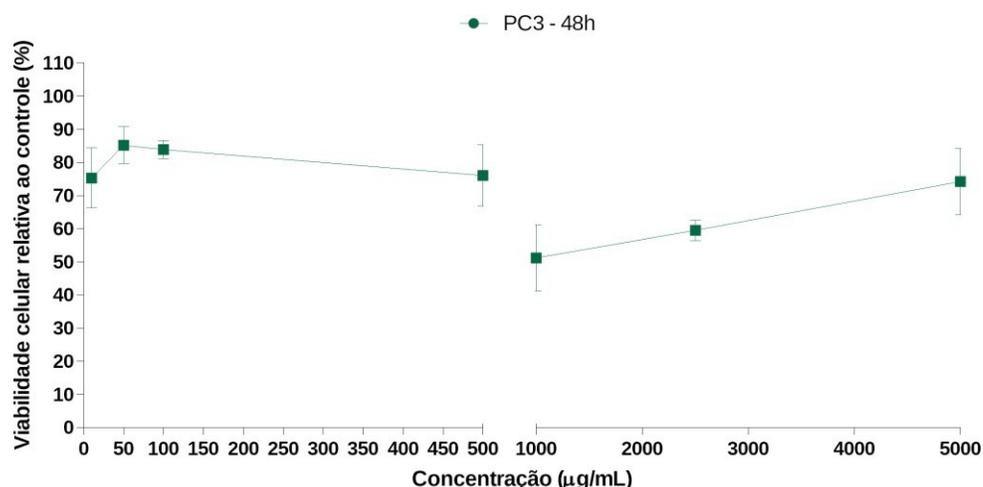


Figura 3. Percentual de inibição da viabilidade relativo ao controle de PC3 após 24h de tratamento

Através da metabolização do sal de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) em formazan pelas enzimas mitocondriais das linhagens de PC-3 e DU-145, foi possível observar que em 48h a linhagem DU145 teve uma perceptível diminuição da viabilidade celular, na concentração de 1000 e 5000 µg/mL no tempo de 48h. A linhagem PC-3 também no tempo de 48h demonstrou atividade citotóxica.

Com base nos resultados de MTT, selecionamos duas concentrações das sete concentrações testadas para os ensaios de ciclo celular e apoptose. As concentrações 1000 µg/mL e 5000 µg/mL foram testadas no tempo de 48h de incubação para visualizarmos quando ocorre a diminuição da viabilidade celular durante o crescimento celular.

Tabela 4. Ciclo Celular da linhagem DU145 tratada com extrato de SJ (1000-5000 µg/mL)

Concentrações de uva integral liofilizada	G₀/G₁	S	G₂/M
Controle	64,63 ±1,65	15,07±2,49	20,29±0,84
1000 µg/mL	68,57 ±0,56	16,02±1,56	15,41±1,30
5000 µg/mL	79,04±1,25***	7,376±1,36**	13,59±1,28**

Os resultados são expressos como porcentagem do total de células.

Diferenças significativas entre células não tratadas (controle) e células tratadas foram comparadas (**p<0,01; ***p<0,001).

Na tabela 4 é demonstrado o aumento do percentual de células na fase G₀/G₁ (79,04±1,25%) e decréscimo de células na fase S (7,37±1,36%) e G₂/M (13,59±1,28) em comparação com o controle na concentração de 5000 µg/mL para a DU145. Na concentração de 1000 µg/mL para a linhagem DU145, assim como em PC-3 (Tabela 5), porém com esta nas duas concentrações, não houve diferença estatística.

Tabela 5. Ciclo Celular da linhagem PC3 tratada com extrato de SJ (1000-5000 µg/mL)

Concentrações de uva integral liofilizada	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
Controle	76,08±0,71	2,39±0,87	21,52±0,82
1000 µg/mL	73,25±0,14	3,96±1,01	22,78±0,87
5000 µg/mL	70,51±1,73	7,21±1,82	20,47±4,00

Os resultados são expressos como porcentagem do total de células.

Diferenças significativas entre células não tratadas (controle) e células tratadas foram comparadas (**p<0,01; ***p<0,001).

No ensaio de apoptose foram avaliadas por citometria de fluxo o tipo de morte celular causada pelos compostos bioativos da uva, e se seria capaz de desencadear o processo apoptótico sem necrose. Para a linhagem de metástase de cérebro (DU145) notamos que ambas concentrações (1000 e 5000 µg/mL) apresentaram diferença estatística em relação ao seu controle com maior percentual de apoptose inicial e tardia (p<0,01 e p<0,001). Com a primeira concentração apresentando apoptose inicial de 12,90±1,24% e tardia com 14,43±2,01% e a última concentração a apoptose inicial de 12,97±3,02% e tardia com 17,40±3,05% e nos dois resultados em relação a necrose não se tem diferença estatística quanto ao controle. É possível também observar esses resultados na figura 4.

Tabela 6. Taxa de apoptose da linhagem DU145 tratada com extrato de SJ (1000-5000 µg/mL)

Concentrações de uva integral liofilizada	Viável	Apoptose Inicial	Apoptose tardia	Necrose
Controle	84,93±2,05	7,42±0,97	5,6±0,91	2,02±0,95
1000 µg/mL	70,47±2,97***	12,90±1,24**	14,43±2,01***	2,74±0,32
5000 µg/mL	66,90±5***	12,97±3,02**	17,40±3,05***	2,74±1,41

Diferenças significativas entre células não tratadas e células tratadas foram comparadas (**p<0,01; ***p<0,001).

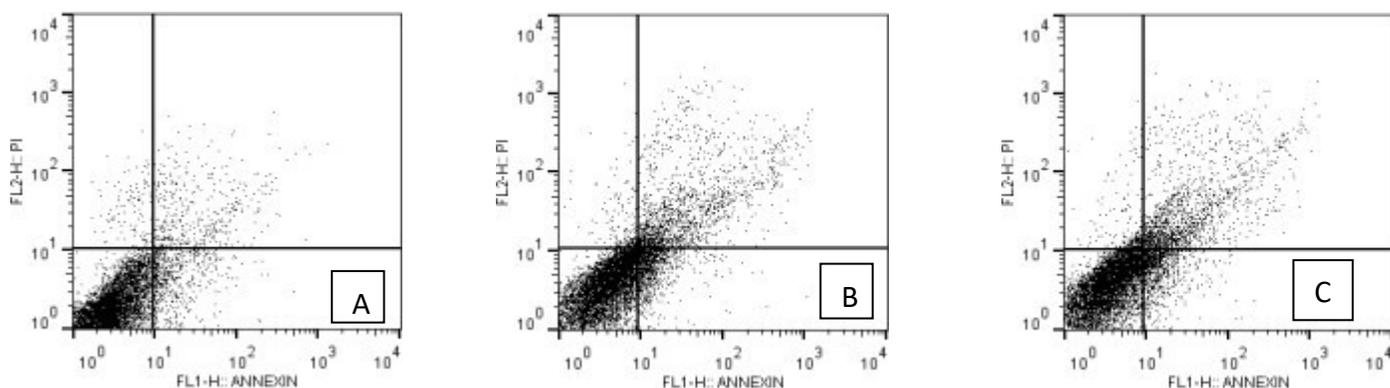


Figura 4. Células DU145 Controle (A) e tratadas com extrato de SJ (1000 µg/mL) (B) e (5000 µg/mL) (C). Os quadrantes de cima para baixo em sentido horário: apoptose inicial (Anexina V+ PI-), apoptose tardia (Anexina V+ PI+), morte não apoptótica (Anexina V- PI+) e células viáveis (Anexina- PI-)

A linhagem de metástase de osso (PC3) não apresentou diferença estatística nos ensaios de ciclo celular e apoptose. (tabela 7 e figura 5) para os respectivos experimentos.

Tabela 7. Taxa de apoptose da linhagem PC#3 tratada com extrato de SJ (1000-5000 µg/mL)

Concentrações de uva integral liofilizada	Viável	Apoptose Inicial	Apoptose tardia	Necrose
Controle	85,85±2,77	2,81±0,55	5,59±1,00	5,75±2,19
1000 µg/mL	90,75±4,43	1,91±2,03	2,89±3,61	3,45±1,31
5000 µg/mL	88,65±7,71	1,67±1,64	2,99±2,83	3,97±3,38

Diferenças significativas entre células não tratadas e células tratadas foram comparadas (**p<0,01; ***p<0,001).

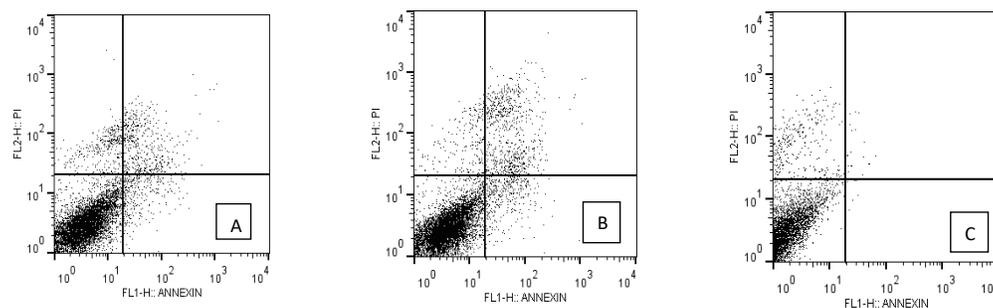


Figura 5. Células PC3 Controle (A) e tratadas com extrato de SJ (1000 µg/mL) (B) e (5000 µg/mL) (C). Os quadrantes de cima para baixo em sentido horário: apoptose inicial (Anexina V+ PI-), apoptose tardia (Anexina V+ PI+), morte não apoptótica (Anexina V- PI+) e células viáveis (Anexina- PI-)

5.1.3 Caracterização do perfil fitoquímico por UPLC-MS^E

Os metabólitos secundários dos extratos de acetona e aquoso das amostras de uva SJ integral e polpa foram determinados por UPLC-MS^E. Globalmente, 67 compostos foram separados e tentativamente identificados (tabela 8) e classificados de acordo com a base de dados *on-line Phenol Explorer* em 4 classes: flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos e outros polifenóis. Todos os parâmetros de identificação utilizados estão apresentados nesta tabela, 9 compostos foram confirmados com os padrões químicos disponíveis (em negrito na tabela).

Tabela 8. Identificação de compostos fenólicos por UPLC-MSE nos extratos de acetona e aquosos das amostras de uva (polpa e integral).

	Putative compound	Molecular Formula	m/z	RT (min)	Score	FS (%)	Mass Error (ppm)	IS (%)	Class	Jub Integral Acetona	Jub Integral Água	Jub Pulp Acetona	Jub Pulp Água
1	Scutellarein	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285.0421	1.14	44.9	47.2	5.68	83.79	Flavonoids	-	x	-	-
2	Pyrogallol	C ₆ H ₆ O ₃	125.0241	1.21	56	85.4	-2.54	97.81	Other polyphenols	x	x	x	x
3	Galic acid	C ₇ H ₆ O ₅	169.0139	1.21	40.7	6.87	-1.99	99.18	Phenolic acids	x	x	x	x
4	Apigenin 7-O-glucoside	C ₂₁ H ₂₄ O ₉	419.1316	1.23	54.2	96.4	-7.45	82.73	Flavonoids	-	x	-	x
5	Galic acid ethyl ester isomer I	C ₉ H ₁₀ O ₅	197.0452	1.25	55.8	91.7	-1.95	89.58	Phenolic acids	x	-	x	-
6	Dihydroxybenzoic acid isomer I	C ₇ H ₆ O ₄	153.0190	1.31	46.5	41.9	-1.95	93.06	Phenolic acids	-	x	-	x
7	Galloylquinic acid isomer I	C ₁₄ H ₁₆ O ₁₀	343.0665	1.35	54.8	89.8	-1.67	86.31	Phenolic acids	-	x	-	x
8	Trihydroxybenzoic acid isomer I	C ₇ H ₆ O ₅	169.0139	1.49	51.2	63.7	-2.21	95.15	Phenolic acids	x	x	x	x
9	Dihydroxybenzoic acid isomer II	C ₇ H ₆ O ₄	153.0190	1.57	38.9	0	-2.41	97.23	Phenolic acids	x	x	x	x
10	Trihydroxybenzoic acid isomer II	C ₇ H ₆ O ₅	169.0139	1.62	38.3	0	-1.82	93.50	Phenolic acids	-	x	-	-
11	Hydroxytyrosol	C ₈ H ₁₀ O ₃	153.0553	1.67	49.5	57.6	-2.56	92.81	Other polyphenols	x	x	x	x
12	Galloylquinic acid isomer II	C ₁₄ H ₁₆ O ₁₀	343.0662	1.68	49.8	68.2	-2.41	83.83	Phenolic acids	x	x	-	x
13	Benzoic acid	C ₇ H ₆ O ₂	121.0289	1.69	50.9	67.6	-4.73	92.26	Phenolic acids	-	-	-	x
14	Galic acid ethyl ester isomer II	C ₉ H ₁₀ O ₅	197.0449	1.73	56.4	92.5	-3.14	92.96	Phenolic acids	-	x	-	-
15	p-Anisaldehyde	C ₈ H ₈ O ₂	135.0449	1.75	37.7	0	-2.12	91.26	Other polyphenols	-	x	-	-
16	Caffeic Acid	C ₉ H ₈ O ₄	179.0347	1.88	48	44.8	-1.70	97.36	Phenolic acids	-	x	-	x
17	Hydroxycoumarin isomer I	C ₉ H ₆ O ₃	161.0241	1.99	54.7	86	-2.10	90.11	Other polyphenols	-	x	-	-
18	Procyanidin dimer isomer I	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	577.1344	2.08	52.3	65.8	-1.26	97.23	Flavonoids	x	x	x	-
19	Hydroxybenzoic acid isomer I	C ₇ H ₆ O ₃	137.0241	2.10	41.7	14.3	-2.48	97.35	Phenolic acids	x	x	x	x
20	Gentisic acid	C ₇ H ₆ O ₄	153.0188	2.15	53.9	81.9	-3.49	91.85	Phenolic acids	-	x	-	-
21	Oleoside dimethylester	C ₁₈ H ₂₆ O ₁₁	417.1396	2.23	36.2	0	-1.55	82.87	Other polyphenols	x	x	-	x
22	4-Hydroxybenzoic acid	C ₇ H ₆ O ₃	137.0241	2.24	39.3	0	-2.51	99.24	Phenolic acids	x	x	x	x

23	Coumaric acid	C ₉ H ₈ O ₃	163.0397	2.24	48.5	51.5	-2.46	93.82	Phenolic acids	-	x	-	-
24	Procyanidin dimer isomer II	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	577.1342	2.25	50.5	61.6	-1.65	92.92	Flavonoids	x	x	-	-
25	Hydroxycoumarin isomer II	C ₉ H ₆ O ₃	161.0243	2.26	41	15.6	-0.68	90.11	Other polyphenols	x	x	-	-
26	Esculetin	C ₉ H ₆ O ₄	177.0189	2.33	39	0	-2.37	97.80	Other polyphenols	-	x	-	-
27	3,4-dihydroxy-5-methoxybenzoic acid	C ₈ H ₈ O ₅	183.0296	2.35	38.1	0	-1.87	92.66	Phenolic acids	x	x	-	-
28	Procyanidin trimer C1	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈	865.1976	2.35	44.2	37.4	-1.10	85.09	Flavonoids	x	x	x	-
29	(+)-Catechin	C₁₅H₁₄O₆	289.0714	2.37	49.4	49.5	-1.20	99.00	Flavonoids	x	x	x	x
30	Hydroxycoumarin isomer III	C ₉ H ₆ O ₃	161.0240	2.38	38.4	2.84	-2.29	91.92	Other polyphenols	x	x	-	-
31	(+)-Gallocatechin / (-)-Epigallocatechin	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	305.0662	2.40	45.5	40.6	-1.45	88.67	Flavonoids	x	x	-	-
32	Luteolin -O-glucoside / 6-Hydroxyluteolin 7-O-rhamnoside / Kaempferol -O-glucoside / Quercetin 3-O-rhamnoside isomer I	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447.0927	2.40	48.3	52.5	-1.22	90.21	Flavonoids	x	x	-	-
33	3,4-Dihydroxyphenylacetic acid	C ₈ H ₈ O ₄	167.0347	2.41	37.7	0	-1.82	90.85	Phenolic acids	-	x	-	-
34	Isorhamnetin 3-O-glucoside	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	477.1032	2.44	36.4	0	-1.41	83.65	Flavonoids	x	x	-	-
35	Feruloyl tartaric acid	C ₁₄ H ₁₄ O ₉	325.0560	2.49	55.1	78	-1.58	99.57	Phenolic acids	x	x	-	x
36	Procyanidin dimer isomer III	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	577.1343	2.54	53.8	76.7	-1.46	93.84	Flavonoids	x	x	-	-
37	Feruloyl glucose	C ₁₆ H ₂₀ O ₉	355.1028	2.57	49.4	57.1	-1.90	92.19	Phenolic acids	x	x	x	x
38	Eriodictyol -O-glucoside / Dihydroquercetin 3-O-rhamnoside isomer I	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	449.1081	2.58	54.3	81.4	-1.78	92.41	Flavonoids	-	x	-	-
39	Hydroxybenzoic acid isomer III	C ₇ H ₆ O ₃	137.0240	2.64	38.7	0	-3.14	97.35	Phenolic acids	-	-	x	-
40	Isorhamnetin 3-O-rutinoside	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	461.1084	2.68	47.5	45.5	-1.26	93.67	Flavonoids	x	x	-	-
41	Psi-tectorigenin / Tectorigenin / 3'-Hydroxymelanettin / Koparin / Hispidulin	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	299.0553	2.70	53.9	86.9	-2.82	85.74	Flavonoids	x	x	-	-
42	3,7-Dimethylquercetin / Jaceosidin	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	329.0659	2.71	50.3	65.9	-2.21	88.00	Flavonoids	x	x	-	x
43	Hydroxybenzoic acid isomer IV	C ₇ H ₆ O ₃	137.0239	2.76	50.9	62.9	-3.96	96.39	Phenolic acids	x	x	x	-
44	(-)-Epicatechin	C₁₅H₁₄O₆	289.0714	2.76	47.7	41.1	-1.11	98.96	Flavonoids	x	x	x	x
45	Eriodictyol -O-glucoside / Dihydroquercetin 3-O-rhamnoside	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	449.1082	2.79	48.2	49.1	-1.53	93.56	Flavonoids	x	x	-	-

46	Dihydroxyphenylacetic acid	C ₈ H ₈ O ₄	167.0345	2.85	50.8	63.7	-2.66	93.60	Phenolic acids	x	x	-	-
47	Scopoletin	C ₁₀ H ₈ O ₄	191.0343	2.85	51.6	73.5	-3.46	88.86	Other polyphenols	-	x	-	-
48	Procyanidin dimer isomer IV	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	577.1343	2.98	37.2	4.82	-1.47	83.04	Flavonoids	x	x	-	-
49	Bergapten / Xanthotoxin	C ₁₂ H ₈ O ₄	215.0331	3.08	39.6	20.5	-8.49	86.97	Other polyphenols	-	x	-	x
50	Myricetin 3-O-glucoside	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃	479.0825	3.09	55.9	81.8	-1.18	98.89	Flavonoids	x	x	-	-
51	Dihydroquercetin 3-O-rhamnoside	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	449.1084	3.39	51.8	71.8	-1.25	88.48	Flavonoids	-	x	-	-
52	Isopimpinellin	C ₁₃ H ₁₀ O ₅	245.0447	3.46	40.5	20.5	-3.30	85.81	Other polyphenols	x	x	-	-
53	Quercetin 3-O-glucuronide	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₃	477.0663	3.46	43.9	25.5	-2.38	97.03	Flavonoids	x	x	-	-
54	6''-O-Malonylgenistin	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₃	517.0978	3.46	40.9	24.8	-1.81	81.93	Flavonoids	-	x	-	-
55	Naringenin / Butein / 6,7,4'-Trihydroxyisoflavanone / Butin	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	271.0606	3.47	48.8	50.3	-2.22	96.56	Flavonoids	x	x	-	-
56	Catechin-O-gallate	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀	441.0822	3.47	48.9	47	-1.21	98.84	Flavonoids	x	x	-	-
57	Quercetin 3-O-glucoside	C₂₁H₂₀O₁₂	463.0877	3.48	55.7	81.1	-1.17	99.07	Flavonoids	x	x	-	x
58	Luteolin -O-glucoside / 6-Hydroxyluteolin 7-O-rhamnoside / Kaempferol -O-glucoside / Quercetin 3-O-rhamnoside isomer II	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447.0925	3.49	46.3	52.2	-1.70	81.14	Flavonoids	x	x	-	-
59	Isoferulic acid	C₁₀H₁₀O₄	193.0501	3.54	37.2	0	-2.54	88.84	Phenolic acids	-	x	-	-
60	Eriodictyol -O-glucoside / Dihydroquercetin 3-O-rhamnoside isomer II	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	449.1083	3.58	52.4	64.5	-1.36	99.06	Flavonoids	x	x	-	x
61	Kaempferol 7-O-glucoside	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447.0927	3.81	57.6	96.9	-1.23	92.73	Flavonoids	x	x	-	x
62	Orobol / Luteolin / Scutellarein / 6,3',4'-Tetrahydroxyisoflavone	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285.0396	3.82	36.1	0	-2.92	83.79	Flavonoids	x	x	-	-
63	Isorhamnetin 3-O-glucoside / Isorhamnetin 3-O-galactoside	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	477.1033	3.88	53.2	71.1	-1.09	96.05	Flavonoids	x	x	x	x
64	6''-O-Malonyldaidzin	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₂	501.1031	3.90	36.9	0	-1.46	86.47	Flavonoids	x	x	-	-
65	Naringin 4'-O-glucoside	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	433.1134	3.97	54.1	76.2	-1.41	95.78	Flavonoids	x	x	-	x
66	Resveratrol 3-O-glucoside	C ₂₀ H ₂₂ O ₈	389.1236	3.98	56.6	97.5	-1.64	87.48	Stilbenes	x	x	-	-
67	Ferulaldehyde	C ₁₀ H ₁₀ O ₃	177.0555	6.60	37.7	0	-1.40	90.37	Other polyphenols	-	-	-	x

m/z: mass/charge; *RT*: retention time; *FS*: fragmentation score; *IS*: isotope similarity. **Bold**: reference standards.

A partir dos compostos identificados, foi construído uma tabela considerando a abundância dos compostos identificados baseado na contagem de íons. Nota-se claramente que o extrato aquoso de uva integral demonstrou maior número de compostos identificados seguido do extrato acetônico de uva integral com 63 e 45 compostos respectivamente, se comparado com os extratos aquoso (26) e acetônico (16) da polpa de SJ. Para a principal classe de cada grupo das amostras, não havendo separação por extrator, sendo os flavonóides na amostra integral e os ácidos fenólicos na amostra da polpa demonstrando que a casca da uva possui grande quantidade de compostos fenólicos e quando se observa essas diferentes composições de compostos bioativos pela extração aquosa e da acetona nota-se que o seu perfil metabólico, ou seja, compostos que são exclusivos para cada extrator como o ácido isoferúlico e ácido gentísico presente somente na extração aquosa da SJ integral favoreceu a sua remoção.

Tabela 9. Classes de compostos bioativos de extratos aquoso e acetônico da uva integral e polpa

Classes (n/%)	Jub Integral Acetona		Jub Integral Água		Jub Polpa Acetona		Jub Polpa Água	
Flavonoides	26	57,78%	31	49,21%	5	31,25%	9	34,62%
Outros polifenóis	6	13,33%	11	17,46%	2	12,5%	5	19,23%
Ácidos Fenólicos	12	26,67%	20	31,75%	9	56,25%	12	46,15%
Estilbenos	1	2,22%	1	1,59%	-	-	-	-
Total	45 (100%)		63 (100%)		16 (100%)		26 (100%)	

n – número de compostos identificados / % - porcentagem total de compostos entre as classes comparado com o total

A classe dos flavonoides foi predominante na uva integral representando 58% quando se utilizou acetona e 49% com uso da água, seguido dos ácidos fenólicos com 27% e 32% e outros polifenóis com 13,33% e 17,46%. O estilbeno foi encontrado apenas nos extratos da uva integral, indicando que esta classe de composto fenólico muito comum na uva, conforme tabela 9, representada pelo resveratrol glicosídeo é proveniente da casca.

Com as amostras da polpa, os ácidos fenólicos representam 56% e 46% para extrato acetônico e para o extrato de água seguido da classe de flavonoides 31% e 35% e outros polifenóis possuindo a proporção de 12,5% e 19%. Em ambas as amostras, observa-se que a água foi mais eficiente para extração de um maior número de compostos fenólicos em todas as classes acima mencionadas.

Para caracterizar e classificar os 4 extratos de uva de acordo com o perfil fitoquímico, utilizou-se a Análise de Componentes Principais (ACP) conforme Figura 4. Sendo possível notar quais foram os metabólitos significativos / representativos para a caracterização e classificação dos extratos de uva por perfil de extrato .

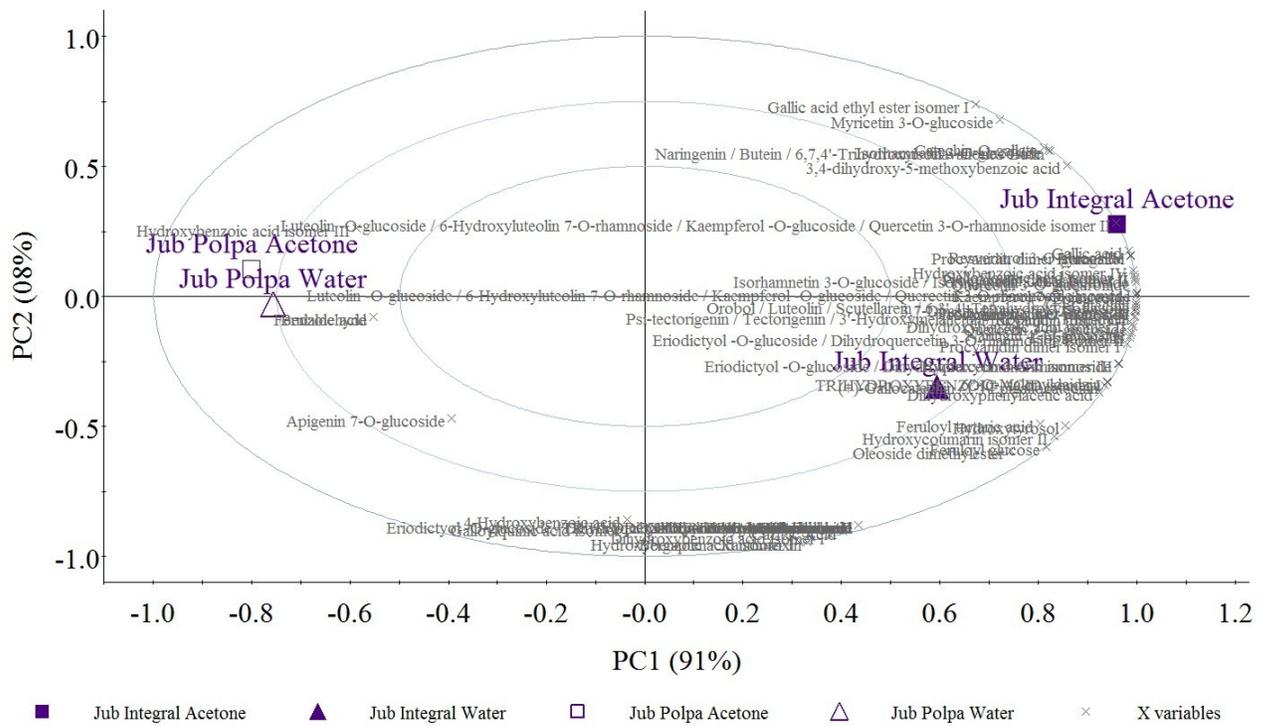


Figura 6. Projeção variável dos compostos fenólicos tentativamente identificáveis em extratos de acetona e água.

Estes parâmetros foram significativamente carregados nos dois principais componentes principais (PC 1 e PC 2), explicando 99% da variância. O primeiro componente principal (PC1) foi capaz de explicar 91% da variação, enquanto o segundo (PC2) explicou 8% da variação total (Figura 4). O gráfico de dispersão dos escores dos extratos de uva para PC1 e PC2 demonstra que o tipo de amostra (polpa ou integral) de uva apresenta

proporções diferentes na sua composição e no perfil de metabólitos extraídos, enquanto que os extratores utilizados extraem metabólitos similares.

A abundância relativa dos compostos que explicaram o ACP pode ser analisada na Figura 7, ou seja, os compostos que são responsáveis por distinguir uma amostra da outra. Cada célula colorida no *heatmap* corresponde à abundância relativa, com compostos em linhas e amostra em colunas.

A epicatequina é um metabólito com grande abundância relativa no extrato aquoso da polpa de uva. No extrato integral com uso da acetona temos isorhamnetina 3-O-glucosídeo, galocatequina/epigalocatequina, kaempferol 7-O-glucosídeo, orobol/luteoloina, dímero de procianidina. Seguido da amostra aquosa da uva integral com quercetina 3-O-glucuronídeo, eriodictiol-O-glucosídeo / diidroquercetina 3-O-ramnosídeo.

A Figura 5 apresenta o *heatmap* baseado na intensidade de 15 metabólitos oriundos de extratos de água e acetona da polpa e fruta integral da uva. A abundância dos metabólitos avaliados por UPLC-MS^E é representadas por cores no eixo x.

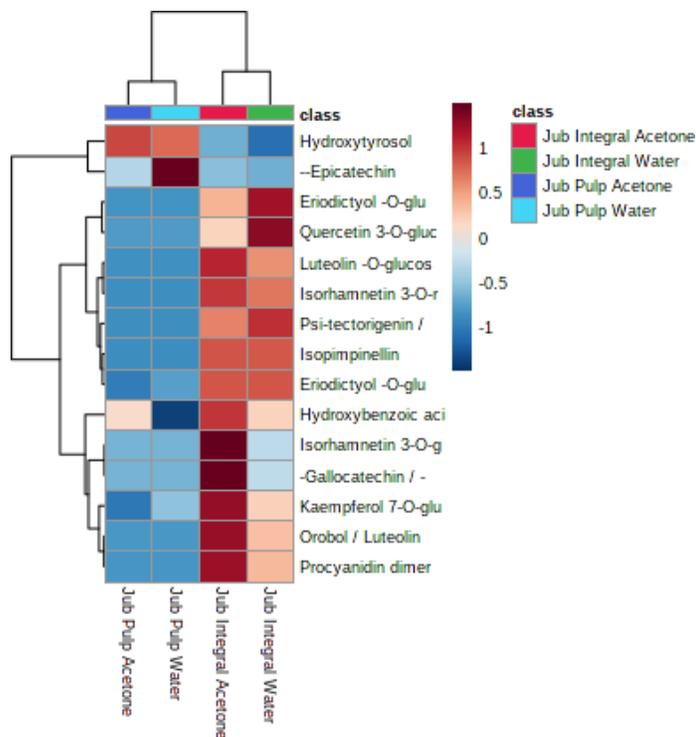


Figura 7. Análise de agrupamento hierárquico (HCA) e mapa de calor dos compostos bioativos nos extratos de Sweet Jubille extraídos com solventes aquosos (Water) e acetanólicos (Acetone), em polpa e fruta integral.

6 Discussão

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar e determinar a influência do extrato de uva híbrida nas linhagens celulares do câncer de próstata humano. Na análise de compostos fenólicos, a SJ demonstrou resultado superior ao encontrados na literatura com uvas não híbridas como Muscadina nobre (*Vitis rotundifolia*) (You et al., 2012), 6 variedades de *Vitis vinifera* L., Fetească neagră e Pinot noir (Balea et al., 2020), Blaufränkisch e Merlot (Pavić et al., 2019), Cabernet Sauvignon e Mamaia (Moldovan et al., 2020), e uma variedade de uva preta chamada Michele Palieri (Milella et al., 2019). Na comparação com outras uvas híbridas (Samoticha et al., 2017), avaliou-se 28 uvas híbridas brancas e vermelhas com resultados de compostos fenólicos variando de 1037,0 mmol ET/g (Cascade cv.) até 5759,1 mmol ET/g (Roesler cv.), o conteúdo dos compostos fenólicos têm vários fatores determinantes, como condições ambientais e de cultivo, grau de maturidade e nas uvas mais escuras se tem o aumento desses compostos no último estágio de maturação.

Nos ensaios de DPPH, ABTS, FRAP e ORAC para atividade antioxidante o extrato obteve elevada capacidade antioxidante. Pelo método de DPPH, os resultados da capacidade de redução se comparados com resultados de Moldovan (2020) com as uvas, Fetească neagră, Cabernet Sauvignon e Mamaia com valores respectivamente 62,48%, 72,43% e 54,93% mostrando menor capacidade antioxidante se comparada com SJ assim como com os resultados de Pavi (2019) com as variedades de *Vitis vinifera* L. Blaufränkisch (57,69%) e Merlot (57,50%). Na comparação do método ABTS, a SJ em comparação com uvas híbridas demonstrou resultado superior ($743851,27 \pm 78475,88 \mu\text{mol ET/g}$) quando comparando com os resultados de de 34,6 mmol ET/g e com de $367,5 \mu\text{mol ET/g}$ para as uvas Millot Rothay e Bordô, obtidos por Samoticha (2017) e Burin et al. (2014), respectivamente. Considerando o ensaio de FRAP, Moldovan apresentou resultados (2019) com as amostras de um mix de bagaço de uva vermelha, uma mistura de partes iguais de das variedades de *Vitis vinifera*: `Pinot Noir`, `Fetească neagră`, `Cabernet Sauvignon` e `Mamaia`, uma segunda a amostra com uva branca em uma mistura de partes iguais de bagaço das variedades `Muscat Ottonel` e `Sauvignon Blanc`, e tendo a última amostra uma mistura de partes iguais de todas as variedades com isso os resultados de FRAP foram respectivamente $2652,50 \pm 6,49 \mu\text{mol ET/g}$, $3908,42 \pm 12,85 \mu\text{mol ET/g}$ e $997,81 \pm 2,18 \mu\text{mol ET/g}$. No método direto, ORAC, a uva Muscadine (*Vitis rotundifolia*) $129,06 \pm 1,97 \mu\text{mol ET/}$

g no trabalho de You (2012) porém com a *Vitis vinifera L.* black grape (cv. “Michele Palieri”) no trabalho de Milella (2019) os resultados foram entre $418,53 \pm 9,50$ $\mu\text{mol ET/g}$ e $687,17 \pm 5,01$ $\mu\text{mol ET/g}$ com as variações de tempo, temperatura e concentração do extrator.

Os resultados da uva híbrida Sweet Jubilee nos ensaios de atividade antioxidante e compostos fenólicos apresentaram resultados expressivos na comparação com a cor do fruto, parte do fruto e diversidade de extrator. Estes resultados geram novas possibilidades para melhor mensuração como a temperatura e tempo correlacionando-se e determinação de extratores candidatos.

É necessário compreender os mecanismos de ação das moléculas bioativas, sabendo que a composição das fontes alimentares, como frutas ou vegetais, consiste em vários polifenóis, representados por diferentes classes de fitoquímicos que trazem benefícios à saúde. A nível molecular, a interação dessas moléculas pode causar a ativação ou inibição de certas vias moleculares (Kumar et al., 2018).

A carcinogênese envolve um processo de estágios múltiplos, como iniciação, promoção e progressão do tumor, que estão intimamente ligados entre si. E as espécies reativas de oxigênio ao reagir com proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, prejudicam o funcionamento celular e danificam as membranas e o material genético das células. E são capazes de reagir com o DNA, gerando danos irreversíveis em genes importantes para o controle do ciclo celular, o que pode culminar, em última análise, na formação de uma célula neoplásica, que vai se dividir descontroladamente até formar massas líquidas ou sólidas (tumores), configurando o câncer. Em contraste com a iniciação, a promoção do tumor é considerada um processo relativamente longo e reversível no qual células pré-neoplásicas em proliferação ativa se acumulam. A progressão, estágio final da transformação neoplásica, envolve o crescimento de um tumor com potencial invasivo e metastático. (Surh, 2003; Nirmala et al., 2017; de Deus et al., 2020).

Nos ensaios com cultura de células: viabilidade celular, ciclo celular e apoptose, os resultados serão discutidos com base nos ensaios que em sua maioria utilizaram, extrato em pó, extrato das sementes da uva, metabólitos secundários sozinhos ou acompanhados do extrato de uva. Segundo (Camby et al., 1994) linha de células PC-3 parece manter um maior grau de diferenciação do que a linha de células DU145, ambas são insensíveis aos

andrógenos e o crescimento é semelhante, pois crescem como colônias. As duas linhagens também assumem a forma de ilhas contendo células poligonais predominantemente adornadas em monocamadas, com elementos no centro se empilhando uns sobre os outros. A linhagem de células PC-3 parece manter um maior grau de diferenciação do que a linha de células DU145.

Para a viabilidade celular, o extrato de uva enriquecido com estilbenos - resveratrol (trans-3,5,4'-trihidroxiestilbeno, Res) e o pterostilbeno (trans-3,5-dimetoxiestilbeno, Pter) - por meio de procedimentos de extração, após 72h de tratamento demonstrando um efeito modesto com extrato em pó contendo diferentes variedades de uva (200 µg / mL) e enquanto Res e Pter inibiram significativamente a viabilidade das células DU145 e PC3 (Kumar et al., 2018). Uma uva selvagem nativa de Taiwan *V. thunbergii* var. *Thunbergii* tem o seu extrato causando a diminuição na porcentagem de células viáveis em 48h na linhagem DU145 (Lin et al., 2018). Em outros tipos de câncer em se tratando da viabilidade celular a uva demonstrou resultados significativos como o câncer de mama com tratamento das linhagens MDA-MB-231 and MCF-7 em 48h ocorreu a redução da viabilidade celular utilizando resveratrol, proantocianidinas de semente de uva e suas combinações (Y. Gao & Tollefsbol, 2018). O câncer de pulmão nas linhagens A549 (adenocarcinoma), H1299 (NSCLC metastático), DMS114 (câncer de pulmão de células pequenas, SCLC) e H23 (adenocarcinoma) foram tratados com procianidina de semente de uva tendo como alvo um micro RNA oncogênico e como resultado após overnight uma redução de 60-70% na viabilidade celular (Xue et al., 2018).

Alterações moleculares associadas à carcinogênese ocorrem nas vias de sinalização celular que regulam a proliferação e diferenciação celular e que mantém a homeostase é a família de serina / treonina quinases dirigidas por prolina (proteínas quinases ativadas por mitogênio - MAPKs). Os cânceres são semelhantes aos produtos de mutações deixando as células sem o ciclo normal de sobrevivência, de crescimento e da sua proliferação pois as células cancerosas são menos dependentes de sinais provenientes de outras células do que as células saudáveis, podendo sobreviver por mais tempo e crescer mais e dividir-se mais do que as células normais e com isso produzindo tumores que podem levar ao óbito. Células cancerosas são definidas por proliferar desafiando as restrições normais e por invadir e colonizar territórios reservados a outras células. Com isso, podem iniciar a tumorigênese

ormando tumor maligno ou benigno se possuir apenas a primeira característica e caso possua as duas características podem gerar um tumor maligno com suas células que podem desprender do tumor primário formando outros tumores (metástase) (Surh, 2003; Alberts et al., 2017).

Os agentes com capacidade significativa para retardar o início do tumor, reduzindo a incidência do tumor e inibindo a sua progressão podem ser chamados de agentes quimio preventivos. Estes são divididos em agentes bloqueadores e agentes supressores. Os agentes bloqueadores evitam que os carcinógenos atinjam os locais-alvo, sofram ativação metabólica ou, subsequentemente, interajam com macromoléculas celulares cruciais (por exemplo, DNA, RNA e proteínas). Os agentes supressores, por outro lado, inibem a transformação maligna das células iniciadas, tanto na fase de promoção quanto na de progressão. Podendo então agir como bloqueador ou na reversão do estágio pré-maligno (iniciação e promoção) da carcinogênese em várias etapas (Surh, 2003; Nirmala et al., 2017).

Nos experimentos de ciclo celular e apoptose, em um trabalho com DU145 em tratamentos de 24 e 48 horas, o extrato induziu a parada da fase G_0/G_1 e morte celular (fase sub G_1), e esses efeitos ocorreram de maneira dependente do tempo e os níveis de proteína associados a essas fases p27, p21 e CDC25A (Western blotting) tiveram um aumento em células DU145 e os níveis de proteína de ciclina E e D diminuíram, as proteínas que tiveram aumento foram associadas com a parada do ciclo celular na fase G_0/G_1 , o extrato também induziu significativamente a morte celular por apoptose levando a marcas morfológicas e bioquímicas, como encolhimento celular, formação de bolhas na membrana e condensação da cromatina nuclear sendo esses efeitos dependentes do tempo (Lin et al., 2018). Em outros trabalhos demonstraram que extrato em pó de semente de uva regulou negativamente a Ciclina D1 e uma ligeira regulação positiva de PTEN – um supressor de tumor, modula a apoptose e ciclo celular e migração - em células DU145, e os níveis de pAkt (promove a sobrevivência celular e impede a apoptose) foram afetados pelo tratamento com o extrato em células PC3 e a expressão de p21 foi induzida de uma maneira dependente da dose após o tratamento com o extrato em PC3 (Agarwal et al., 2000; Kumar et al., 2018).

Em uma fração polifenólica isolada de sementes de uva rica em procianidinas testadas na linhagem DU145 trouxe resultados sugestivos de que esse tratamento possivelmente envolve a modulação da sinalização mitogênica e reguladores do ciclo celular

e indução da parada da fase G1, inibição do crescimento celular e morte apoptótica (Agarwal et al., 2000), segundo Yar Khan e colaboradores (2012) sua atividade diferencial em direcionar seletivamente as células cancerosas enquanto preserva as células normais atuando como pró-oxidantes, através da indução e a degradação do DNA na presença de íons metálicos como o cobre. Esse mecanismo para os polifenóis que envolve a mobilização do cobre ligado à cromatina e a consequente ação pró-oxidante que leva à morte celular possuem atividade anticâncer e indutoras de apoptose. Uma vez que é conhecido que os níveis de cobre nos tecidos e células são significativamente elevados em uma série de doenças malignas, as células cancerosas estariam mais sujeitas a ciclos redox entre íons cobre e polifenóis para gerar espécies reativas de oxigênio (ROS) responsáveis pela quebra do DNA.

Em outros tipos de câncer como o colorretal (Ravindranathan et al., 2019). O uso de proantocianidinas oligoméricas de extratos de sementes de uva demonstrou a parada do ciclo celular, quebras de fita dupla e acúmulo da proteína p53 nas células. No câncer de pulmão (Mao et al., 2016) extrato de procianidina de semente de uva inibiu de forma dependente da dose a proliferação e induziu a apoptose e regulou negativamente o microRNA conhecidos como oncomirs que podem mediar efeitos pró ou antitumorais.

O uso de metabólitos secundários separados na quimioprevenção tem uma baixa biodisponibilidade e metabolismo rápido, limitando os estudos, por isso utilizar o extrato de uva que contém uma mistura de compostos bioativos pode apresentar farmacocinética e potência farmacológica superior a metabólitos isolados, portanto maior potencial como medicamento de produto natural (Kumar et al., 2018). Por isso também verificamos os compostos presentes na uva SJ para a caracterização dos compostos fenólicos.

A (-)-epicatequina pode exercer ação cardioprotetora (Panneerselvam et al., 2010; Ramirez-Sanchez et al., 2010), e ao ser coexposto com outros metabólitos esse flavonoide tem aumentada a sua biodisponibilidade (Sanchez-Bridge et al., 2015), Os efeitos na distribuição do ciclo celular mostraram que a interrupção do ciclo celular na fase G2 foi induzida, atividades supressivas foram associadas ao grau de oligomerização (Takanashi et al., 2017). A isorhamnetina 3-O-glucosídeo foi capaz de mitigar lesões hepáticas (Igarashi et al., 2008) também mostrou inibição mais forte se comparados com outros flavonoides nas células CaCo-2 (F. Gao et al., 2020). Com a galocatequina/epigalocatequina, na ação

combinada da Curcumina pode reduzir a expressão da Hsp90 eventualmente controlando a inflamação, a Hsp90 é uma chaperona molecular envolvida na estabilização de proteínas inflamatórias (Umme Hani et al., 2019). E (-) O galato de epigallocatequina pode funcionar como um agente anti apoptótico inibindo a fosforilação induzida por H₂O₂ de fosforilação da c-Jun N-terminal quinase e p38 ativada por MAPK (Choi et al., 2005) , epigallocatequina também é um potente antioxidante e a administração combinada de dexametasona com epigallocatequina aumentou a eficácia antiartrítica da terapia com dexametasona basal e suprimiu a fase de desenvolvimento da progressão artrítica em ratos (Roy et al., 2013). O metabólito secundário, kaempferol 7-O-glucosídeo, quando encontrado como um dos principais compostos combinado com outros flavonoides tem potencial na inibição de radicais livres (Pandey et al., 2020). Um potente inibidor da fosfatidilinositol 4-quinase (PI4K), orobol, produziu sensibilidade à cisplatina 2 vezes maior em células de carcinoma de ovário humano, reduzindo o nível de citocromo c (Isonishi et al., 2003). A luteoloina induz a morte celular da linhagem tumoral de neuroblastoma SH-SY5Y, com a inibição do crescimento de células induzindo apoptose acompanhada de parada de crescimento do ciclo celular G₀/G₁ e perda concomitante do potencial de membrana mitocondrial (F. Wang et al., 2014). O dímero de procianidina e seus metabólitos antioxidantes preveniram a progressão da formação de catarata por sua ação antioxidante, as moléculas maiores podem contribuir para a atividade anticatarata (Yamakoshi et al., 2002). O dímero de procianidina também inibe citocinas pró-inflamatórias, TLRs e inativam células T naïve ao inibir a secreção de interferon- γ e IL-2 demonstrando ter um papel imunofarmacológico na resposta imune contra o desenvolvimento e progressão de muitas doenças crônicas (Sung et al., 2013). A quercetina-3-O-glucuronídeo (Q3G) direcionada ao cérebro pode modular simultaneamente vários mecanismos independentes de modificação da doença de Alzheimer como a beta amolóide que reduziu a geração de peptídeos (Ho et al., 2013). O Q3G suprimiu os efeitos da noradrenalina nas células do câncer de mama humano, pois esse endógeno induz a dano oxidativo, e proliferação de células de câncer de mama (Yamazaki et al., 2014). Com eriodictiol-O-glucosídeo / diidroquercetina 3-O-ramnosídeo não foi encontrado trabalhos experimentais com cultura de células. Estes compostos foram tentativamente identificados na SJ pela primeira vez (Tabela 8) e são parcialmente semelhantes aos achados da literatura como os flavonóides epicatequina, quercetina e catequina, os ácidos fenólicos como o ácido

gálico e ácido cafeico (Chafer et al., 2005; Zeghad et al., 2019; Sochorova et al., 2020), encontrados em extratos de uvas integral, polpa e semente.

7 Conclusão

Os extratos de etanol e metanol apresentaram os melhores resultados para as análises de atividade antioxidante e de compostos fenólicos totais enquanto o extrator composto por metanol 50% e acetona 70% demonstrou maior quantidade desses compostos na uva híbrida *Sweet jubilee*.

Para caracterização da uva híbrida foram identificados 67 compostos sendo os flavonoides, polifenóis, ácidos fenólicos e estilbenos as classes encontradas na fruta integral e na polpa.

A uva integral liofilizada foi capaz de causar efeito citotóxico, demonstrado nos resultados de viabilidade celular, seus compostos inibiram o crescimento e a proliferação celular em PC-3 e em DU145 a inibição do crescimento e morte apoptótica pela parada do ciclo celular na fase G0/G1.

O expressivo resultado de atividade antioxidante e compostos fenólicos presentes na uva híbrida *Sweet jubilee* desta forma apresenta as possibilidades biotecnológicas para sua aplicação seja na área de saúde ou na área de alimentos, como um possível antioxidante na indústria alimentícia.

Aspectos ainda não elucidados podem ser respondidos com a continuidade desse trabalho incluindo células saudáveis como controle e um comparativo do fármaco atual para tratamento do câncer de próstata com a utilização da uva em seu extrato etanólico e ensaios de biologia molecular como PCR e Western Blot e futuros estudos *in vivo* e ensaios clínicos.

8 Referências Bibliográficas

- Abe, L. T., Mota, R. V. D., Lajolo, F. M., & Genovese, M. I. (2007). Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. *Food Science and Technology*, 27(2), 394-400.
- Adams, L. S., Kanaya, N., Phung, S., Liu, Z., & Chen, S. (2011). Whole blueberry powder modulates the growth and metastasis of MDA-MB-231 triple negative breast tumors in nude mice. *Journal of Nutrition*, 141(10), 1805-1812.
<https://doi.org/10.3945/jn.111.140178>
- Agarwal, C., Sharma, Y., & Agarwal, R. (2000). Anticarcinogenic Effect of a Polyphenolic Fraction Isolated From Grape Seeds in Human Prostate Carcinoma DU145 Cells: Modulation of Mitogenic Signaling and Cell-Cycle Regulators and Induction of G1 Arrest and Apoptosis. *Molecular Carcinogenesis*, 28(3), 129-138. [https://doi.org/10.1002/1098-2744\(200007\)28:3<129::AID-MC1>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/1098-2744(200007)28:3<129::AID-MC1>3.0.CO;2-0)
- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., ... & Walter, P. (2017). *Fundamentos da Biologia Celular-4*. Artmed Editora.
- Al-Mamary, M. A., & Moussa, Z. (2021). Antioxidant Activity: The Presence and Impact of Hydroxyl Groups in Small Molecules of Natural and Synthetic Origin. In *Antioxidants*. IntechOpen.
- Al-Nemari, R., Al-Senaidy, A., Senglali, A., Ismael, M., Badjah-Hadj-Ahmed, A. Y., & Ben Bacha, A. (2020). GC-MS profiling and assessment of antioxidant, antibacterial, and anticancer properties of extracts of *Annona squamosa* L. leaves. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12906-020-03029-9>
- Almatroodi, S. A., Almatroudi, A., Alsahli, M. A., & Rahmani, A. H. (2020). Grapes and their Bioactive Compounds: Role in Health Management Through Modulating Various Biological Activities. *Phcogj.Com Pharmacognosy Journal*, 12(6), 1455-1462.
<https://doi.org/10.5530/pj.2020.12.200>
- Alves-Silva, J. M., Romane, A., Efferth, T., & Salgueiro, L. (2017). North African Medicinal plants traditionally used in cancer therapy. In *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 8, Issue JUN). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00383>
- Angelo, P. M., & Jorge, N. (2007). Compostos fenólicos em alimentos-uma breve revisão. *Revista do Instituto Adolfo Lutz* (Impresso), 66(1), 01-09.

- Araújo, J.L.P.; Correia, R.C.(2008). Análise do custo de produção e rentabilidade do cultivo da uva fina de mesa sem sementes produzida na região do Submédio São Francisco. XIII Simpósio de Engenharia de Produção (SIMPEP), Bauru, São Paulo.
- Asami, D. K., Hong, Y. J., Barrett, D. M., & Mitchell, A. E. (2003). Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried and air-dried marionberry, strawberry, and corn grown using conventional, organic, and sustainable agricultural practices. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(5), 1237-1241.
- Atak, Arif; ALTINDISLI, Ahmet; GOKSEL, Zekiye. (2011). Phytochemical properties of some grapevine (*Vitis vinifera* L.) hybrids. *Am. J. Food Technol*, v. 6, p. 843-850.
- Atak, A.; Akkurt, M.; Polat, Z.; Çelik, H.; Kahraman, K.A.; Akgül, D.S.; Özer, N.; Söylemezoğlu, G.; Şire, G.G.; Eibach, R. (2017). Susceptibility to downy mildew (*Plasmopara viticola*) and powdery mildew (*Erysiphe necator*) of different *Vitis* cultivars and genotypes. *Ciência e Técnica Vitivinícola*, Oeiras, v.32, n.1, p.23-32.
- Averilla, J. N., Oh, J., Kim, H. J., Kim, J. S., & Kim, J. S. (2019). Potential health benefits of phenolic compounds in grape processing by-products. In *Food Science and Biotechnology* (Vol. 28, Issue 6, pp. 1607-1615). The Korean Society of Food Science and Technology. <https://doi.org/10.1007/s10068-019-00628-2>
- Balea, Ş. S., Pârvu, A. E., Pârvu, M., Vlase, L., Dehelean, C. A., & Pop, T. I. (2020). Antioxidant, Anti-Inflammatory and Antiproliferative Effects of the *Vitis vinifera* L. var. Fetească Neagră and Pinot Noir Pomace Extracts. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 1. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00990>
- Basli, A., Belkacem, N., & Amrani, I. (2017). Health benefits of phenolic compounds against cancers. Phenolic compounds-Biological activity. London, UK: IntechOpen, 193-210.
- Bernardini, S., Tiezzi, A., Laghezza Masci, V., & Ovidi, E. (2018). Natural products for human health: an historical overview of the drug discovery approaches. In *Natural Product Research* (Vol. 32, Issue 16, pp. 1926-1950). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1356838>
- Burin, V. M., Ferreira-Lima, N. E., Panceri, C. P., & Bordignon-Luiz, M. T. (2014). Bioactive compounds and antioxidant activity of *Vitis vinifera* and *Vitis labrusca* grapes: Evaluation of different extraction methods. *Microchemical Journal*, 114, 155-163. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2013.12.014>
- Camargo, A. C.; Maia, J. D. G.; Nachtigal, J. C. (2005). BRS Violeta: nova cultivar de uva para suco e vinho de mesa. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 8 p. (Comunicado Técnico, 63).

- Camby, I., Dedecker, R., Danguy, A., Pasteels, J.-L., Kiss, R., Petein, M., Etievant, C., & Van Velthoven, R. (1994). Influence of culture media on the morphological differentiation of the PC-3 and DU145 prostatic neoplastic cell lines. *The Prostate*, 24(4), 187-196.
<https://doi.org/10.1002/pros.2990240404>
- Careri, M., Corradini, C., Elviri, L., Nicoletti, I., & Zagnoni, I. (2003). Direct HPLC analysis of quercetin and trans-resveratrol in red wine, grape, and winemaking byproducts. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(18), 5226-5231.
- Castañeda-Ovando, A., de Lourdes Pacheco-Hernández, M., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A., & Galán-Vidal, C. A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food chemistry*, 113(4), 859-871.
- Castillo-Muñoz, N., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., Gómez, M. V., Velders, A. H., & Hermosín-Gutiérrez, I. (2009). Flavonol 3-O-glycosides series of *Vitis vinifera* cv. Petit Verdot red wine grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(1), 209-219.
- Chafer, A., Pascual-Martí, M. C., Salvador, A., & Berna, A. (2005). Supercritical fluid extraction and HPLC determination of relevant polyphenolic compounds in grape skin. *Journal of Separation Science*, 28(16), 2050-2056.
- Choi, Y. J., Jeong, Y. J., Lee, Y. J., Kwon, H. M., & Kang, Y. H. (2005). (-)Epigallocatechin gallate and quercetin enhance survival signaling in response to oxidant-induced human endothelial apoptosis. *Journal of Nutrition*, 135(4), 707-713.
<https://doi.org/10.1093/jn/135.4.707>
- Chudzik, M., Korzonek-Szlacheta, I., & Król, W. (2015). Triterpenes as potentially cytotoxic compounds. *Molecules*, 20(1), 1610-1625.
- Dangl, G. S., Mendum, M. L., Yang, J., Walker, M. A., & Preece, J. E. (2015). Hybridization of cultivated *Vitis vinifera* with wild *V. californica* and *V. girdiana* in California. *Ecology and evolution*, 5(23), 5671-5684.
- Darweesh, R. S., El-Elimat, T., Zayed, A., Khamis, T. N., Babaresh, W. M., Arafat, T., & Al Sharie, A. H. (2020). The effect of grape seed and green tea extracts on the pharmacokinetics of imatinib and its main metabolite, N-desmethyl imatinib, in rats. *BMC Pharmacology and Toxicology*, 21(1), 1-15.
- de Deus, M. H. A., Martins, J. M., Júnior, G. D. A., & Orsolin, P. C. (2020). Efeito modulador da uva rubi (*Vitis vinifera*) na supressão de tumores epiteliais induzidos por doxorubicina em *Drosophila melanogaster*. *Brazilian Journal of Health Review*, 3(6), 15660-15676.
- Deng, Q., Penner, M. H., & Zhao, Y. (2011). Chemical composition of dietary fiber and polyphenols of five different varieties of wine grape pomace skins. *Food Research International*, 44(9), 2712-2720.

- Eyduran, S. P., Akin, M., Ercisli, S., Eyduran, E., & Maghradze, D. (2015). Sugars, organic acids, and phenolic compounds of ancient grape cultivars (*Vitis vinifera* L.) from Iğdir province of Eastern Turkey. *Biological research*, 48(1), 1-8.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Production quantities by country. Faostat. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/>> Acesso em: 28 março 2021
- FAOSTAT (2020). Crops. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Acesso: 16 de março de 2021.
- Fidelis, Moura, Kabbas Junior, Pap, Mattila, Mäkinen, Putnik, Bursać Kovačević, Tian, Yang, & Granato. (2019). Fruit Seeds as Sources of Bioactive Compounds: Sustainable Production of High Value-Added Ingredients from By-Products within Circular Economy. *Molecules*, 24(21), 3854. <https://doi.org/10.3390/molecules24213854>
- Gao, F., Fu, Y., Yi, J., Gao, A., Jia, Y., & Cai, S. (2020). Effects of different dietary flavonoids on dipeptidyl peptidase-IV activity and expression: Insights into structure-activity relationship. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(43), 12141-12151. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c04974>
- Gao, Y., & Tollefsbol, T. O. (2018). Combinational proanthocyanidins and resveratrol synergistically inhibit human breast cancer cells and impact epigenetic-Mediating machinery. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8). <https://doi.org/10.3390/ijms19082204>
- GIOVANNINI, E. (2008). Produção de uvas para vinho, suco e mesa. 3. ed. Porto Alegre: Renascença.
- GLEASON, D. F.; MELLINGER, G. T. (1974). Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *Journal of Urology*, v. 111, n. 1, p. 58-64.
- Gollücke, A. P. B., De Souza, J. C., & de Queiroz Tavares, D. (2008). (+)-Catechin and (-)-epicatechin levels of concentrated and ready-to-drink grape juices through storage. *International journal of food science & technology*, 43(10), 1855-1859.
- Gurak, P. D., Cabral, L. M., Rocha-Leão, M. H. M., Matta, V. M., & Freitas, S. P. (2010). Quality evaluation of grape juice concentrated by reverse osmosis. *Journal of food engineering*, 96(3), 421-426.
- Gürbüz, O., Göçmen, D., Dağdelen, F., Gürsoy, M., Aydın, S., Şahin, İ., ... & Usta, M. (2007). Determination of flavan-3-ols and trans-resveratrol in grapes and wine using HPLC with fluorescence detection. *Food Chemistry*, 100(2), 518-525.

- Hamza, A. A., Heeba, G. H., Elwy, H. M., Murali, C., El-Awady, R., & Amin, A. (2018). Molecular characterization of the grape seeds extract's effect against chemically induced liver cancer: In vivo and in vitro analyses. *Scientific reports*, 8(1), 1-16.
- Heidenreich, A., Bastian, P. J., Bellmunt, J., Bolla, M., Joniau, S., van der Kwast, T. H., ... & Zattoni, F. (2008). Diretrizes sobre câncer da próstata. *Eur Urol*, 53(1), 68-80.
- Ho, L., Ferruzzi, M. G., Janle, E. M., Wang, J., Gong, B., Chen, T. Y., Lobo, J., Cooper, B., Wu, Q. L., Talcott, S. T., Percival, S. S., Simon, J. E., & Pasinetti, G. M. (2013). Identification of brain-targeted bioactive dietary quercetin-3-O- glucuronide as a novel intervention for Alzheimer's disease. *FASEB Journal*, 27(2), 769-781. <https://doi.org/10.1096/fj.12-212118>
- Hoshino, T., Takagi, H., Naganuma, A., Koitabashi, E., Uehara, S., Sakamoto, N., Kudo, T., Sato, K., & Kakizaki, S. (2013). Advanced hepatocellular carcinoma responds to MK615, a compound extract from the Japanese apricot "Prunus mume ". *World Journal of Hepatology*, 5(10), 596-600. <https://doi.org/10.4254/wjh.v5.i10.596>
- Hou, C. P., Lin, Y. H., Hsieh, M. C., Chen, C. L., Chang, P. L., Huang, Y. C., & Tsui, K. H. (2015). Identifying the variables associated with pain during transrectal ultrasonography of the prostate. *Patient preference and adherence*, 9, 1207.
- Howell, G.S. (2001). Sustainable grape productivity and the growth-yield relationship: A review. *American Journal of Enology and Viticulture*, v.52, n.3: p. 165-174.
- Hung, L. V. M., Moon, J. Y., Ryu, J. yeon, & Cho, S. K. (2019). Nootkatone, an AMPK activator derived from grapefruit, inhibits KRAS downstream pathway and sensitizes non-small-cell lung cancer A549 cells to adriamycin. *Phytomedicine*, 63. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2019.153000>
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2015. 122 p.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2017. 128 p.
- IARC. (2020). World cancer report 2020. In *World Health Organization*. <http://publications.iarc.fr/Non-Series-Publications/World-Cancer-Reports/World-Cancer-Report-2014>
- Igarashi, K., Mikami, T., Takahashi, Y., & Sato, H. (2008). Comparison of the preventive activity of isorhamnetin glycosides from atsumi-kabu (Red Turnip, Brassica, campestris L.) leaves on carbon tetrachloride-induced liver injury in mice. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 72(3), 856-860. <https://doi.org/10.1271/bbb.70558>

- Isonishi, S., Saitou, M., Yasuda, M., Ochiai, K., & Tanaka, T. (2003). Enhancement of sensitivity to cisplatin by orobol is associated with increased mitochondrial cytochrome c release in human ovarian carcinoma cells. *Gynecologic Oncology*, *90*(2), 413-420. [https://doi.org/10.1016/S0090-8258\(03\)00316-0](https://doi.org/10.1016/S0090-8258(03)00316-0)
- Itoh, T., Ono, A., Kawaguchi, K., Teraoka, S., Harada, M., Sumi, K., Ando, M., Tsukamasa, Y., Ninomiya, M., Koketsu, M., & Hashizume, T. (2018). Phytol isolated from watermelon (*Citrullus lanatus*) sprouts induces cell death in human T-lymphoid cell line Jurkat cells via S-phase cell cycle arrest. *Food and Chemical Toxicology*, *115*, 425-435. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.03.033>
- Jackson, R. S. (1994). *Wine Science: principles and applications*. San Diego: Academic.
- Kist, B.B.; Carvalho, C.; Treichel, M.; Santos, C.E. (2018). *Anuário Brasileiro da Fruticultura 2018*. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 88 p.
- Kluska, M., Juszczak, M., Wysokiński, D., Żuchowski, J., Stochmal, A., & Woźniak, K. (2019). Kaempferol derivatives isolated from: *Lens culinaris* Medik. reduce DNA damage induced by etoposide in peripheral blood mononuclear cells. *Toxicology Research*, *8*(6), 896-907. <https://doi.org/10.1039/c9tx00176j>
- Krishnamachary, B., Subramaniam, D., Dandawate, P., Ponnurangam, S., Srinivasan, P., Ramamoorthy, P., Umar, S., Thomas, S. M., Dhar, A., Septer, S., Weir, S. J., Attard, T., & Anant, S. (2019). Targeting transcription factor TCF4 by γ -Mangostin, a natural xanthone. *Oncotarget*, *10*(54), 5576-5591. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.27159>
- Kumar, A., D'silva, M., Dholakia, K., & Levenson, A. S. (2018). In vitro anticancer properties of table grape powder extract (GPE) in prostate cancer. *Nutrients*, *10*(11). <https://doi.org/10.3390/nu10111804>
- Iacopini, P., Baldi, M., Storchi, P., & Sebastiani, L. (2008). Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro antioxidant activity and interactions. *Journal of Food Composition and Analysis*, *21*(8), 589-598.
- Lall, R. K., Syed, D. N., Adhami, V. M., Khan, M. I., & Mukhtar, H. (2015). Dietary polyphenols in prevention and treatment of prostate cancer. *International journal of molecular sciences*, *16*(2), 3350-3376.
- LEE, J.; RENNAKER, C.; WRÖLSTAD, R. E. (2008). Correlation of two anthocyanin quantification methods: HPLC and spectrophotometric methods. *Food Chemistry*, Kindlington, v. 110, n. 3, p. 782-786.
- LEITZMANN, M. F.; ROHRMANN, S. Risk factors for the onset of prostatic cancer: age, location, and behavioral correlates. *Clinical Epidemiology*, v. 4, p. 1-11, 2012.

- Li, C. X., Zhao, X. H., Zuo, W. F., Zhang, T. L., Zhang, Z. Y., & Chen, X. Sen. (2020). Phytochemical profiles, antioxidant, and antiproliferative activities of four red-fleshed apple varieties in China. *Journal of Food Science*, 85(3), 718-726. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15056>
- Lim, H. S., Kim, Y. J., Sohn, E., Yoon, J., Kim, B. Y., & Jeong, S. J. (2019). Annona atemoya leaf extract ameliorates cognitive impairment in amyloid- β injected Alzheimer's disease-like mouse model. *Experimental Biology and Medicine*, 244(18), 1665-1679. <https://doi.org/10.1177/1535370219886269>
- Lin, C.-H., Chan, H.-S., Tsay, H.-S., Funayama, S., Kuo, C.-L., & Chung, J.-G. (2018). Ethyl acetate fraction from methanol extraction of *Vitis thunbergii* var. *taiwaniana* induced G0/G1 phase arrest via inhibition of cyclins D and E and induction of apoptosis through caspase-dependent and -independent pathways in human prostate carcinoma DU1. *Environmental Toxicology*, 33(1), 41-51. <https://doi.org/10.1002/tox.22491>
- Lucioli, S., Pastorino, F., Nota, P., Ballan, G., Frattarelli, A., Fabbri, A., Forni, C., & Caboni, E. (2019). Extracts from cell suspension cultures of strawberry (*fragaria x ananassa* duch): Cytotoxic effects on human cancer cells. *Molecules*, 24(9). <https://doi.org/10.3390/molecules24091738>
- Ma, L., Wang, B., Long, Y., & Li, H. (2017). Effect of traditional Chinese medicine combined with Western therapy on primary hepatic carcinoma: a systematic review with meta-analysis. In *Frontiers of Medicine* (Vol. 11, Issue 2, pp. 191-202). Higher Education Press. <https://doi.org/10.1007/s11684-017-0512-0>
- Makris, D. P., Kallithraka, S., & Kefalas, P. (2006). Flavonols in grapes, grape products and wines: Burden, profile and influential parameters. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(5), 396-404.
- Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémésy C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr*. Jan;81(1 Suppl):230S-242S. doi: 10.1093/ajcn/81.1.230S. PMID: 15640486.
- Mao, J. T., Smoake, J., Park, H. K., Lu, Q. Y., & Xue, B. (2016). Grape seed procyanidin extract mediates antineoplastic effects against lung cancer via modulations of prostacyclin and 15-hete eicosanoid pathways. *Cancer Prevention Research*, 9(12), 925-932. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-16-0122>
- Maru, G. B., Hudlikar, R. R., Kumar, G., Gandhi, K., & Mahimkar, M. B. (2016). Understanding the molecular mechanisms of cancer prevention by dietary phytochemicals: From experimental models to clinical trials. *World journal of biological chemistry*, 7(1), 88.

- Mato, I., Suárez-Luque, S., & Huidobro, J. F. (2005). A review of the analytical methods to determine organic acids in grape juices and wines. *Food Research International*, 38(10), 1175-1188.
- Milella, R. A., Basile, T., Alba, V., Gasparro, M., Giannandrea, M. A., Debiase, G., Genghi, R., & Antonacci, D. (2019). Optimized ultrasonic-assisted extraction of phenolic antioxidants from grape (*Vitis vinifera* L.) skin using response surface methodology. *Journal of Food Science and Technology*, 56(10), 4417-4428. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03946-9>
- Misikangas, M., Pajari, A. M., Päivärinta, E., Oikarinen, S. I., Rajakangas, J., Marttinen, M., Tanayama, H., Törrönen, R., & Mutanen, M. (2007). Three Nordic berries inhibit intestinal tumorigenesis in multiple intestinal neoplasia/+ mice by modulating β -catenin signaling in the tumor and transcription in the mucosa. *Journal of Nutrition*, 137(10), 2285-2290. <https://doi.org/10.1093/jn/137.10.2285>
- Moldovan, M. L., Bogdan, C., Iurian, S., Roman, C., Oniga, I., & Benedec, D. (2020). Phenolic content and antioxidant capacity of pomace and canes extracts of some vitis vinifera varieties cultivated in Romania. *Farmacia*, 68, 1. <https://doi.org/10.31925/farmacia.2020.1.3>
- Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival : Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. v. 65, p. 55-63.
- Mullen, W., Marks, S. C., & Crozier, A. (2007). Evaluation of phenolic compounds in commercial fruit juices and fruit drinks. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(8), 3148-3157.
- Muñoz-Espada AC, Wood KV, Bordelon B, Watkins BA. (2004). Anthocyanin quantification and radical scavenging capacity of Concord, Norton, and Marechal Foch grapes and wines. *J Agric Food Chem*. Nov 3;52(22):6779-86. doi: 10.1021/jf040087y. PMID: 15506816.
- Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2020). Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. In *Journal of Natural Products* (Vol. 83, Issue 3, pp. 770-803). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>
- Nijveldt, R. J., Van Nood, E. L. S., Van Hoorn, D. E., Boelens, P. G., Van Norren, K., & Van Leeuwen, P. A. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American journal of clinical nutrition*, 74(4), 418-425.
- Nirmala, J. G., & Narendhirakannan, R. T. (2017). *Vitis vinifera* peel and seed gold nanoparticles exhibit chemopreventive potential, antioxidant activity and induce apoptosis

through mutant p53, Bcl-2 and pan cytokeratin down-regulation in experimental animals. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 89, 902-917.

- Ochiai, A. (2017). Changes in the roles of transrectal ultrasonography for the diagnosis of prostate cancer. *Journal of Medical Ultrasonics*, v. 44, p. 1-2.
- Pandey, B. P., Pradhan, S. P., Adhikari, K., & Nepal, S. (2020). *Bergenia pacumbis* from Nepal, an astonishing enzymes inhibitor. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 20(1), 198. <https://doi.org/10.1186/s12906-020-02989-2>
- Panneerselvam, M., Tsutsumi, Y. M., Bonds, J. A., Horikawa, Y. T., Saldana, M., Dalton, N. D., Head, B. P., Patel, P. M., Roth, D. M., & Patel, H. H. (2010). Dark chocolate receptors: Epicatechin-induced cardiac protection is dependent on δ -opioid receptor stimulation. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 299(5). <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00073.2010>
- Pavić, V. P., Kujundžić, T., Kojić, M. K., Jukić, V. J., Braun, U., Schwander, F., & Drenjančević, M. D. (2019). Effects of Defoliation on Phenolic Concentrations, Antioxidant and Antibacterial Activity of Grape Skin Extracts of the Varieties Blaufränkisch and Merlot (*Vitis vinifera* L.). *Molecules*, 24, 2444. <https://doi.org/10.3390/molecules24132444>
- Pedast Saar, P., Vaher, M., Helmja, K., Kulp, M., Kaljurand, M., Karp, K., ... & Püssa, T. (2014). Chemical composition of red wines made from hybrid grape and common grape (*Vitis vinifera* L.) cultivars. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences*, 63(4), 444.
- Pezzuto, J. M. (2008). Grapes and human health: a perspective. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v. 56, n. 16, p. 6777-6784.
- Pinto, T., Aires, A., Cosme, F., Bacelar, E., Morais, M. C., Oliveira, I., ... & Gonçalves, B. (2021). Bioactive (poly) phenols, Volatile Compounds from Vegetables, Medicinal and Aromatic Plants. *Foods* 2021, 10, 106.
- Pozarowski, P., & Darzynkiewicz, Z. (2004). Analysis of cell cycle by flow cytometry. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 281, 301-311
- Prior, R. L. (2015). Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits. *Journal of Functional Foods*, Vol. 18, pp. 797-810.
- Ramirez-Sanchez, I., Maya, L., Ceballos, G., & Villarreal, F. (2010). (-)-Epicatechin activation of endothelial cell endothelial nitric oxide synthase, nitric oxide, and related signaling pathways. *Hypertension*, 55(6), 1398-1405. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.147892>

- Ravindranathan, P., Pasham, D., & Goel, A. (2019). Oligomeric proanthocyanidins (OPCs) from grape seed extract suppress the activity of ABC transporters in overcoming chemoresistance in colorectal cancer cells. *Carcinogenesis*, 40(3), 412-421. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgy184>
- Rebeck, T. R., Devesa, S. S., Chang, B. L., Bunker, C. H., Cheng, I., Cooney, K. & Zeigler-Johnson, C. M. (2013). Global patterns of prostate cancer incidence, aggressiveness, and mortality in men of African descent. *Prostate cancer*.
- Rizzon, L. A., & Link, M. (2006). Composição do suco de uva caseiro de diferentes cultivares. *Ciência Rural*, 36(2), 689-692.
- Rockenbach, I. I., Rodrigues, E., Gonzaga, L. V., Caliari, V., Genovese, M. I., Gonçalves, A. E. D. S. S., & Fett, R. (2011). 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*, 127(1), 174-179.
- Roy, S., Sannigrahi, S., Ghosh, B., Pusp, P., & Roy, T. (2013). Combination therapy of dexamethasone with epigallocatechin enhances tibiotarsal bone articulation and modulates oxidative status correlates with cartilage cytokines expression in the early phase of experimental arthritis. *European Journal of Pharmacology*, 698(1-3), 444-454. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.11.004>
- Rufino, M. do S. M., Alves, R. E., Brito, E. S. de, Moraes, S. M. de, Sampaio, C. de G., Pérez-Jiménez, J., & Saura-Calixto, F. D. (2007). Comunicado Técnico da Embrapa 127 - *Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH*. Comunicado Técnico Embrapa 127, 1-4.
- Rufino, M. do S. M., Alves, R. E., Brito, E. S., Moraes, S. M. de, & Sampaio, C. de G. (2006). *Metodologia Científica: determinação da atividade antioxidantes total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP)*. Comunicado Técnico 125, 3-6.
- Rufino, M. do S. M., Brito, R. E. A. E. S. de, de Moraes, S. M., Sampaio, C. de G., Pérez-Jiménez, J., & Saura-Calixto, F. D. (2007). *Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS +* (pp. 0-3). pp. 0-3. Fortaleza -CE.
- Rugină, D., Sconța, Z., Leopold, L., Pinteă, A., Bunea, A., & Socăciu, C. (2012). Antioxidant activities of chokeberry extracts and the cytotoxic action of their anthocyanin fraction on hela human cervical tumor cells. *Journal of Medicinal Food*, 15(8), 700-706. <https://doi.org/10.1089/jmf.2011.0246>

- Russo, G. I., Campisi, D., Di Mauro, M., Regis, F., Reale, G., Marranzano, M., ... & Morgia, G. (2017). Dietary consumption of phenolic acids and prostate cancer: A case-control study in sicily, Southern Italy. *Molecules*, 22(12), 2159.
- Samoticha, J., Wojdyło, A., & Golis, T. (2017). Phenolic composition, physicochemical properties and antioxidant activity of interspecific hybrids of grapes growing in Poland. *Food Chemistry*, 215, 263-273. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.147>
- Sanchez-Bridge, B., Lévêques, A., Li, H., Bertschy, E., Patin, A., & Actis-Goretti, L. (2015). Modulation of (-)-epicatechin metabolism by coadministration with other polyphenols in caco-2 cell model. *Drug Metabolism and Disposition*, 43(1), 9-16. <https://doi.org/10.1124/dmd.114.060590>
- Sautter, C. K., Denardin, S., Alves, A. O., Mallmann, C. A., Penna, N. G., & Hecktheuer, L. H. (2005). Determinação de resveratrol em sucos de uva no Brasil. *Food Science and Technology*, 25(3), 437-442.
- Seca, A. M. L., & Pinto, D. C. G. A. (2018). Plant secondary metabolites as anticancer agents: Successes in clinical trials and therapeutic application. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19, Issue 1). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms19010263>
- Silva, R.P.F.F.; Rocha-Santos, T.A.P.; Duarte, A.C. (2016). Supercritical fluid extraction of bioactive compounds. *Trends in Analytical Chemistry*, 76, 40-51.
- Singleton, V. L.; Rossi, J. A.; Jr, J. (1965). Colorimetry Of Total Phenolics W I T H A C I D Reagents.
- Singh, R. P., Tyagi, A. K., Dhanalakshmi, S., Agarwal, R., & Agarwal, C. (2004). Grape seed extract inhibits advanced human prostate tumor growth and angiogenesis and upregulates insulin-like growth factor binding protein-3. *International journal of cancer*, 108(5), 733-740.
- Siriwoharn, T., Wrolstad, R. E., Finn, C. E., & Pereira, C. B. (2004). Influence of cultivar, maturity, and sampling on blackberry (*Rubus* L. Hybrids) anthocyanins, polyphenolics, and antioxidant properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 8021-8030.
- Sochorova, L., Prusova, B., Jurikova, T., Mlcek, J., Adamkova, A., Baron, M., & Sochor, J. (2020). The study of antioxidant components in grape seeds. *Molecules*, 25(16), 3736.
- SOCIEDADE AMERICANA DO CÂNCER. Cancer facts & figures 2016. Atlanta: Sociedade Americana do Câncer; 2016.

- Speer, H., D’Cunha, N. M., Alexopoulos, N. I., McKune, A. J., & Naumovski, N. (2020). Anthocyanins and human health—A focus on oxidative stress, inflammation and disease. *Antioxidants*, 9(5), 366.
- Spier, A. P., Bavaresco, C. S., Wyse, Â. T., Carvalho, D., & Sarkis, J. J. F. (2007). Effects of resveratrol and purple grape juice on nucleotide hydrolysis by adult rat serum. *Food chemistry*, 103(2), 565-571.
- Sung, N. Y., Yang, M. S., Song, D. S., Kim, J. K., Park, J. H., Song, B. S., Park, S. H., Lee, J. W., Park, H. J., Kim, J. H., Byun, E. B., & Byun, E. H. (2013). Procyanidin dimer B2-mediated IRAK-M induction negatively regulates TLR4 signaling in macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 438(1), 122-128. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.07.038>
- Surh, Y. J. (2003). Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature Reviews Cancer*, 3(10), 768-780.
- Tada, K., Kawahara, K., Matsushita, S., Hashiguchi, T., Maruyama, I., & Kanekura, T. (2012). MK615, a *Prunus mume* Steb. Et Zucc (‘Ume’) Extract, Attenuates the Growth of A375 Melanoma Cells by Inhibiting the ERK1/2-Id-1 Pathway. *Phytotherapy Research*, 26(6), 833-838. <https://doi.org/10.1002/ptr.3645>
- Takanashi, K., Suda, M., Matsumoto, K., Ishihara, C., Toda, K., Kawaguchi, K., Senga, S., Kobayashi, N., Ichikawa, M., Katoh, M., Hattori, Y., Kawahara, S. ichi, Umezawa, K., Fujii, H., & Makabe, H. (2017). Epicatechin oligomers longer than trimers have anti-cancer activities, but not the catechin counterparts. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08059-x>
- Tariq, A., Sadia, S., Pan, K., Ullah, I., Mussarat, S., Sun, F., Abiodun, O. O., Batbaatar, A., Li, Z., Song, D., Xiong, Q., Ullah, R., Khan, S., Basnet, B. B., Kumar, B., Islam, R., & Adnan, M. (2017). A systematic review on ethnomedicines of anti-cancer plants. In *Phytotherapy Research* (Vol. 31, Issue 2, pp. 202-264). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/ptr.5751>
- Terral, J. F., Tabard, E., Bouby, L., Ivorra, S., Pastor, T., Figueiral, I., ... & This, P. (2010). Evolution and history of grapevine (*Vitis vinifera*) under domestication: new morphometric perspectives to understand seed domestication syndrome and reveal origins of ancient European cultivars. *Annals of botany*, 105(3), 443-455.
- Timsina, B., & Nadumane, V. K. (2015). Mango seeds: A potential source for the isolation of bioactive compounds with anti-cancer activity. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci*, 7, 89-95. <https://innovareacademics.in/journals/index.php/ijpps/article/view/4535/6787>

- Vinson, J. A., Su, X., Zubik, L., & Bose, P. (2001). Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(11), 5315-5321.
- Umme Hani, Kandagalla, S., B. S., S., K, J., & Hanumanthappa, M. (2019). Network Pharmacology Approach Uncovering Pathways Involved in Targeting Hsp90 Through Curcumin and Epigallocatechin to Control Inflammation. *Current Drug Discovery Technologies*, 18(1), 127-138. <https://doi.org/10.2174/1570163816666191210145652>
- van den Berg, R. A., Hoefsloot, H. C., Westerhuis, J. A., Smilde, A. K., & van der Werf, M. J. (2006). Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. *BMC genomics*, 7(1), 1-15.
- van Engeland, M., Nieland, L. J. W., Ramaekers, F. C. S., Schutte, B., & Reutelingsperger, C. P. M. (1998). Annexin V-Affinity assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*, 31(1), 1-9.
- Vanamala, J. (2017). Food systems approach to cancer prevention. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (Vol. 57, Issue 12, pp. 2573-2588). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1028023>
- VINDELOV, L. L. (1977). Flow microfluorometric analysis of nuclear DNA in cells from solid tumors and cell suspensions. A new method for rapid isolation and straining of nuclei. *Virchows Archiv. B, Cell pathology*, v. 24, n. 3, p. 227-42, ago.
- Wang, F., Gao, F., Pan, S., Zhao, S., & Xue, Y. (2014). Luteolin induces apoptosis, G0/G1 cell cycle growth arrest and mitochondrial membrane potential loss in neuroblastoma brain tumor cells. *Drug Research*, 65(2), 91-95. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1372648>
- Wang, L. S., Dombkowski, A. A., Seguin, C., Rocha, C., Cukovic, D., Mukundan, A., Henry, C., & Stoner, G. D. (2011). Mechanistic basis for the chemopreventive effects of black raspberries at a late stage of rat esophageal carcinogenesis. *Molecular Carcinogenesis*, 50(4), 291-300. <https://doi.org/10.1002/mc.20634>
- Wang, L. S.; Stoner, G. D. Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Letters*, Kidlington, v. 269, n. 2, p. 281-290, Oct. 2008.
- Wang, Y., Qian, J., Cao, J., Wang, D., Liu, C., Yang, R., Li, X., & Sun, C. (2017). Antioxidant capacity, anticancer ability and flavonoids composition of 35 citrus (*Citrus reticulata* Blanco) varieties. *Molecules*, 22(7). <https://doi.org/10.3390/molecules22071114>
- Willis, M. S., & Wians Jr, F. H. (2003). The role of nutrition in preventing prostate cancer: a review of the proposed mechanism of action of various dietary substances. *Clinica chimica acta*, 330(1-2), 57-83.

- World Health Organization. (2020). WHO report on cancer: setting priorities, investing wisely and providing care for all. World Health Organization. In *World Health Organization*. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/330745>
- Wu, Y., Zhang, W., Duan, S., Song, S., Xu, W., Zhang, C., ... & Wang, S. (2018). In-depth aroma and sensory profiling of unfamiliar table-grape cultivars. *Molecules*, 23(7), 1703.
- Wutke, E. B., Terra, M. M., Pires, E. J. P., Ribeiro, I. J. A., & Peche Filho, A. (2011). Produtividade da videira 'Niagara Rosada' em cultivo intercalar com adubos verdes. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 33(SPE1), 528-535
- Xue, B., Lu, Q.-Y., Massie, L., Qualls, C., & Mao, J. T. (2018). Grape seed procyanidin extract against lung cancer: the role of microRNA-106b, bioavailability, and bioactivity. *Oncotarget*, 9(21), 15579-15590. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24528>
- Yamakoshi, J., Saito, M., Kataoka, S., & Tokutake, S. (2002). Procyanidin-rich extract from grape seeds prevents cataract formation in hereditary cataractous (ICR/f) rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(17), 4983-4988. <https://doi.org/10.1021/jf0201632>
- Yamazaki, S., Miyoshi, N., Kawabata, K., Yasuda, M., & Shimoi, K. (2014). Quercetin-3-O-glucuronide inhibits noradrenaline-promoted invasion of MDA-MB-231 human breast cancer cells by blocking β 2-adrenergic signaling. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 557, 18-27. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.05.030>
- Yar Khan, H., Zubair, H., Fahad Ullah, M., Ahmad, A., & Mumtaz Hadi, S. (2012). A prooxidant mechanism for the anticancer and chemopreventive properties of plant polyphenols. *Current Drug Targets*, 13(14), 1738-1749.
- You, Q., Chen, F., Wang, X., Sharp, J. L., & You, Y. (2012). Analysis of Phenolic Composition of Noble Muscadine (*Vitis rotundifolia*) by HPLC-MS and the Relationship to Its Antioxidant Capacity. *Journal of Food Science*, 77(10). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02888.x>
- Zeghad, N., Ahmed, E., Belkhiri, A., Heyden, Y. Vander, & Demeyer, K. (2019). Antioxidant activity of *Vitis vinifera*, *Punica granatum*, *Citrus aurantium* and *Opuntia ficus indica* fruits cultivated in Algeria. *Heliyon*, 5(4), e01575. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01575>
- Zhu, X. rong, Wang, H., Sun, J., Yang, B., Duan, X. wu, & Jiang, Y. ming. (2019). Pericarp and seed of litchi and longan fruits: constituent, extraction, bioactive activity, and potential utilization. In *Journal of Zhejiang University: Science B* (Vol. 20, Issue 6, pp. 503-512). Zhejiang University Press. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1900161>

Harvard Health Publishing – Harvard Medical School. Atualizado em: <13/10/2020>. Disponível em: <http://www.health.harvard.edu/mens-health/4-tips-for-coping-with-an-enlarged-prostate>. Acessado em 24/02/2021

Conselho Editorial do PDQ® Adult Treatment. PDQ Prostate Cancer Treatment. Bethesda, MD: National Cancer Institute. Atualizado <09/10/2020>. Disponível em: <https://www.cancer.gov/types/prostate/patient/prostate-treatment-pdq>. Acessado em <24 / 02 / 2021>.[PMID: 26389353]

Instituto Nacional do Câncer. Atualizado em: <21/08/2020>. <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-prostata>. Acessado em < 24/02/2021>

The Plant List. Disponível em: <http://www.theplantlist.org/>. Acessado em <24/02/2021>