



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**Luana Schmidt**

**Efeito da presença de ocratoxina A em vinho tinto sobre perfil fenólico, atividade antioxidante *in vitro* e marcadores de danos oxidativos em *Caenorhabditis elegans***

Porto Alegre

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**Luana Schmidt**

**Efeito da presença de ocratoxina A em vinho tinto sobre perfil fenólico, atividade antioxidante *in vitro* e marcadores de danos oxidativos em *Caenorhabditis elegans***

Dissertação apresentada ao Programa De Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Área de concentração: Toxicologia de Alimentos.

Orientador (a): Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Paula Rossini Augusti

Co-orientador (a): Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Juliane Elisa Welke

Porto Alegre

2019

**Luana Schmidt**

**Efeito da presença de ocratoxina A em vinho tinto sobre perfil fenólico, atividade antioxidante *in vitro* e marcadores de danos oxidativos em *Caenorhabditis elegans***

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos para obtenção do título de  
**MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

Dissertação apresentada ao Programa De Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador (a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Paula Rossini Augusti

Aprovado em \_\_/\_\_/\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Componente da banca examinadora: Dr.<sup>a</sup> Vivian Caetano Bochi - UFCSPA

---

Componente da banca examinadora: Dr.<sup>a</sup> Sabrina Somacal - UFSM

---

Componente da banca examinadora: Dr. Vitor Manfroi - UFRGS

### CIP - Catalogação na Publicação

Schmidt, Luana

EFEITO DA PRESENÇA DE OCRATOXINA A EM VINHO TINTO  
SOBRE PERFIL FENÓLICO, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE IN VITRO  
E MARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS EM CAENORHABDITIS  
ELEGANS / Luana Schmidt. -- 2019.

82 f.

Orientadora: Paula Rossini Augusti.

Coorientadora: Juliane Elisa Welke.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia  
de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e  
Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Interação entre a ocratoxina A e os compostos  
fenólicos presentes em vinho Cabernet Sauvignon. I.  
Rossini Augusti, Paula, orient. II. Elisa Welke,  
Juliane, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

***Dedicatória***

*Aos meus pais, Valdir e Iara e ao meu irmão, Nicolas.*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Valdir e Iara. Com certeza não estaria onde estou hoje se não fosse por vocês. Obrigada pelo amor, pela educação que me deram e por sempre me apoiar nas minhas escolhas. Amo vocês mais que tudo! Essa conquista é para vocês!!!!

Ao meu irmão Nicolas, pelos conselhos, pelo ombro e colo quando mais precisei. Tu sempre vai ser minha metade serena e tranquila!

Ao meu namorado Rafa, por todo apoio, carinho e cuidado. Por me deixar surtar (só um pouquinho) e continuar me mantendo tranquila e otimista nesse finalzinho enlouquecedor... Te amo!

A minha orientadora Paula e minha co-orientadora Juliane, por todo o conhecimento compartilhado nestes dois anos, pelos conselhos e puxões de orelha e por acreditarem na realização desse trabalho. Obrigada por serem meus exemplos de dedicação e amor por ensinar.

A minha metade loira, Lívia, que mesmo a distância se fez presente em todos os momentos, aturando meus surtos, me fazendo enxergar o lado bom de coisas não tão boas, me fazendo rir e chorar ao mesmo tempo... Te amo rapariga!

As minhas maridas Lina e Geovana, e ao Diogo por todo o apoio, carinho e cuidado que sempre tiveram comigo. Vocês são um pedacinho da minha família, amo vocês!

Aos meus ICs, Natália, Júlia, Tiago e Isabella por toda a dedicação que tiveram para a concretização desse trabalho. O que seria de mim sem vocês?

Ao nosso time do Lab 118, Tássia, Laura, Julia, Karol e Larissa por tornarem meus dias mais divertidos e acolhedores.

A Mariane, não só minha vizinha, mas um dos maiores presentes que o mestrado me deu. Obrigada por todas as conversas, choros, conselhos, surtos, risos compartilhados ao longo destes anos. Meu presente pra vida!

Aos vizinhos do Lab 116, Fernanda, Lili, Junior, Loly e Andréa pelos momentos divididos e todas as experiências compartilhadas. Vocês são os melhores vizinhos!

Ao time LATOX, Solange, Gabi, Otávio, Ingrid, Wesley e Stefany por me acolherem tão bem no laboratório. Em especial a Gabi, pela paciência em me ensinar e por toda a confiança e cuidado.

Ao Prof<sup>o</sup> Eliseu pelo auxílio na determinação do perfil fenólico das amostras deste estudo, e a Prof<sup>a</sup> Bruna pelo auxílio no teste de atividade antioxidante utilizando o método ORAC.

Aos professores, técnicos e demais funcionários que colaboraram com a realização deste trabalho.

Aos membros da banca Vitor Manfroi, Sabrina Somacal e Vivian Bochi por aceitarem contribuir com este trabalho.

A CAPES pelo apoio financeiro.

E ao PPG em Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFRGS pela oportunidade de aperfeiçoamento em curso de tamanha excelência.

**RESUMO** - O consumo de vinho tinto tem crescido nos últimos anos em função de suas características sensoriais e funcionais, sendo esta última associada às concentrações consideráveis de compostos fenólicos, entre eles, flavonóides, antocianinas, flavonóis, ácidos fenólicos e estilbenos. Um dos principais contaminantes deste produto é a micotoxina ocratoxina A (OTA), produzida por fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* e com efeitos tóxicos conhecidos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da presença de OTA em vinho Cabernet Sauvignon sobre o perfil de compostos fenólicos, atividade antioxidante *in vitro* e efeito sobre marcadores de danos oxidativos em *Caenorhabditis elegans*. O vinho Cabernet Sauvignon livre de OTA foi adicionado de concentrações crescentes da OTA (1, 2 e 4  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) e os ensaios realizados 24h após a adição da micotoxina. As amostras de vinho foram submetidas a análise de identificação e quantificação dos compostos fenólicos utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, acoplado ao Detector de Arranjo de Diodos e ao espectrômetro de massas (HPLC-DAD/MS). O potencial antioxidante *in vitro* do vinho foi avaliado pelos ensaios da 2-desoxirribose, oxidação da glutatona (GSH), método ABTS e método ORAC. A avaliação de dano oxidativo *in vivo* foi realizada utilizando o nematoide *C. elegans* através de exposição dos vermes às amostras por 30 minutos. Após a exposição, a taxa de sobrevivência, geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), lipoperoxidação (LPO) e expressão das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) foram avaliadas. O vinho livre de OTA apresentou elevado potencial antioxidante em todos os ensaios *in vitro* ( $p \leq 0,05$ ) e foram identificados e quantificados 23 compostos fenólicos (11 antocianinas, 3 flavonols, 7 ácidos fenólicos e 2 derivados estilbenos). A adição de OTA em todas as concentrações induziu aumento ( $p \leq 0,05$ ) na geração do radical hidroxil ( $\cdot\text{OH}$ ) e reduziu a capacidade do vinho de proteger a GSH da oxidação induzida pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Concomitantemente, o vinho em presença de OTA apresentou menores níveis ( $p \leq 0,05$ ) de flavonols, antocianinas e ácidos fenólicos quando comparado ao vinho livre de OTA. A adição de OTA ao vinho tinto induziu uma menor geração de EROs e isso pode estar associado ao aumento da expressão da SOD ( $p \leq 0,05$ ) quando comparado ao vinho livre de OTA. A expressão de CAT foi alterada ( $p \leq 0,05$ ) apenas na menor concentração de OTA (1  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), o que pode estar associado ao aumento dos níveis de LPO observadas neste grupo. Assim, o presente estudo demonstra a importância de se avaliar a interação entre compostos benéficos e contaminantes presentes na dieta humana.

**Palavras-chave:** Espécies reativas de oxigênio; micotoxinas; Compostos fenólicos.

**ABSTRACT** - The consumption of red wine has grown in recent years due to its sensorial and functional characteristics, the latter being associated with considerable phenolic compounds concentrations among them flavonoids, anthocyanins, flavonols, phenolic acids and stilbenes. One of the main contaminants of this product is mycotoxin ochratoxin A (OTA), produced by fungi of the strain *Aspergillus* and *Penicillium* and with known toxic effects. The objective of this work was to evaluate the OTA effect on Cabernet Sauvignon wine on the phenolic compounds profile, antioxidant activity *in vitro* and effect on markers of oxidative damage in *Caenorhabditis elegans*. OTA-free Cabernet Sauvignon wine was added with increasing concentrations of OTA (1, 2 and 4  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) and trials performed 24 hours after addition of mycotoxin. The wine samples were submitted to phenolic compounds identification and quantification using high performance liquid chromatography, coupled to the Diodes Array Detector and the mass spectrometer (HPLC-DAD / MS). The *in vitro* antioxidant potential of the wine was evaluated by the 2-deoxyribose assays, glutathione oxidation (GSH), ABTS method and ORAC method. *In vivo* oxidative damage assessment was performed using the nematode *C. elegans* by exposing the worms to the samples for 30 minutes. After the exposure, the survival rate, reactive oxygen species (ROS) generation, lipid peroxidation (LPO) and antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) expression were evaluated. OTA-free red wine had a high antioxidant potential in all *in vitro* tests ( $p \leq 0.05$ ) and 23 phenolic compounds (11 anthocyanins, 3 flavonols, 7 phenolic acids and 2 stilbene derivatives) were identified and quantified. OTA addition at all concentrations induced increase ( $p \leq 0.05$ ) in hydroxyl (OH) radical generation and reduced the wine's ability to protect GSH from oxidation induced by  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Concomitantly, wine in OTA presence presented lower levels ( $p \leq 0.05$ ) of flavonols, anthocyanins and phenolic acids when compared to OTA-free wine. OTA addition to red wine induced a lower ROS generation and this may be associated with increased SOD expression ( $p \leq 0.05$ ) when compared to OTA-free wine. CAT expression was altered ( $p \leq 0.05$ ) only in the lower OTA concentration (1  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), which may be associated with LPO levels increase in this group. Thus, the present study demonstrates the importance of evaluating the interaction between beneficial compounds and contaminants present in the human diet.

**Keywords:** Reactive oxygen species; mycotoxins; phenolic compounds.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Estrutura química dos principais compostos flavonoides.....	19
<b>Figura 2</b> – Estrutura química dos principais compostos não-flavonoides.....	21
<b>Figura 3</b> – Esquema simplificado ilustrando o mecanismo de geração de EROs no interior das mitocôndrias, incluindo radical hidroxil ( $\bullet\text{OH}$ ), ânion superóxido ( $\text{O}_2\bullet^-$ ) e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ); e ação dos antioxidantes endógenos em organismos vivos. SOD: superóxido dismutase; CAT: catalase; GPx: glutathione peroxidase; GR: glutathione reductase; GSH: glutathione reduzida; GSSG: glutathione oxidada.....	23
<b>Figura 4</b> – Estrutura química da OTA.....	25
<b>Figura 5</b> – Estrutura corporal de um verme adulto hermafrodita (A) e macho (B).....	32
<b>Figura 6</b> – Ciclo de vida do <i>C. elegans</i> a 20 °C na fase embrionária, nos estágios larvais (L1-L4) e na fase adulta.....	33

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Composição fenólica de vinhos Cabernet Sauvignon de algumas regiões do mundo.....	18
<b>Tabela 2</b> – Ocorrência de OTA em vinhos produzidos em alguns locais do mundo.....	27
<b>Tabela 3</b> – Estudos avaliando os principais efeitos da co-exposição entre OTA e compostos fenólicos/vinho tinto em diferentes modelos experimentais.....	28
<b>Tabela 4</b> – Efeito de micotoxinas em presença/ausência de compostos bioativos sobre <i>C. elegans</i> .....	34

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AAPH - 2,2'-azobis-2-amidinopropano.
- ABTS - 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico).
- BEN - Nefropatia Endêmica dos Balcãs.
- C. elegans* - *Caenorhabditis elegans*.
- CAT – Catalase.
- DAD – Detector de Arranjo de Diodos.
- DCFH-DA - 2'-7'-dichlorofluoresceína diacetate.
- DMSO - Dimetil sulfoxido.
- DNA – Ácido desoxirribonucleico.
- DTNB - 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzoico).
- EROs – Espécies reativas de oxigênio.
- GFP – Proteína Fluorescente Verde.
- GSH – Glutathiona.
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de hidrogênio.
- LOD – Limite de Detecção.
- LOQ – Limite de Quantificação.
- MDA - Malondialdeído.
- LMT – Limite Máximo Tolerável.
- NGM – Meio para crescimento de nematoide.
- ORAC - Capacidade de absorbência do radical oxigênio;
- OTA – Ocratoxina A.
- SOD - Superóxido dismutase.
- SPE – Extração em fase sólida.
- TBA - Ácido 2-tiobarbiturico.
- TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbiturico.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	14
2. OBJETIVOS .....	16
2.1 Objetivo geral.....	16
2.2 Objetivos específicos .....	16
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	17
3.1 Produção e consumo de vinhos tintos finos .....	17
3.2 Compostos bioativos em vinhos .....	17
3.3 Estresse oxidativo.....	22
3.4 Contaminação fúngica e micotoxicológica de uvas e seus derivados .....	24
3.4.1 Ocratoxina A.....	24
3.5 Efeito de compostos bioativos sobre o potencial tóxico da OTA .....	27
3.6 Métodos para determinação de danos oxidativos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .....	29
3.7 Modelo alternativo ao uso de animais de experimentação - <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	31
3.8 Uso de <i>C. elegans</i> na avaliação da toxicidade de micotoxinas .....	34
4. APRESENTAÇÃO .....	36
5. MANUSCRITO .....	37
6. DISCUSSÃO GERAL .....	70
7. CONCLUSÕES .....	74
8. REFERÊNCIAS.....	75

## 1. INTRODUÇÃO

O consumo de vinho tinto e suco de uva tem crescido no decorrer dos últimos anos em função de suas características sensoriais e propriedades funcionais. As propriedades funcionais destes produtos se devem as concentrações consideráveis de compostos fenólicos como antocianinas, flavonóis, ácidos fenólicos e estilbenos (SUN et al., 2002). Dentre os vinhos consumidos mundialmente, estão os provenientes da cultivar Cabernet Sauvignon produzidos a partir de uvas europeias (*Vitis vinífera*) (ZOCCHÉ et al., 2017). Diferentes estudos relacionados aos compostos fenólicos de vinhos tintos têm indicado que o consumo moderado desta bebida está relacionado a redução na incidência de doenças cardiovasculares (BOBAN et al., 2016) e câncer (JANNIN et al., 2004), além de prevenir doenças neurodegenerativas (SARUBBO et al, 2017).

Entretanto, a dieta humana constitui-se como um complexo sistema que inclui além dos compostos bioativos também os contaminantes alimentares, sendo importante avaliar o efeito da presença de um composto tóxico sobre a atividade benéfica do outro composto. Dentre os principais contaminantes em matrizes alimentares estão as micotoxinas. A micotoxina predominante encontrada em uvas e seus derivados é a ocratoxina A (OTA), produzida por espécies de fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (FREIRE et al., 2017).

Pesquisas demonstrando o potencial carcinogênico, nefrotóxico, teratogênico e imunotóxico da OTA em animais, levaram a Agência Internacional de Pesquisas do Câncer (IARC) a classificá-la no grupo 2B, como possivelmente cancerígena para humanos (IARC, 1993). A carcinogenicidade desta toxina envolve diferentes mecanismos, incluindo: inibição da síntese proteica, disfunção mitocondrial, alteração da homeostase do cálcio, formação de adutos com o DNA e produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (MCLAUGHLIN et al., 2004; MARIN-KUAN et al., 2008; BOUAZIZ et al., 2008). Além disso, a OTA apresenta potencial neurotóxico evidenciado em animais de laboratório, afetando diferentes estruturas do sistema nervoso central, bem como algumas regiões neurogênicas (SAVA et al., 2006a; SAVA et al., 2006b; ZHANG et al., 2009; PARADELLS et al., 2015).

Modelos alternativos ao uso de animais de experimentação (ratos, coelhos camundongos, entre outros) vêm sendo desenvolvidos ao longo dos últimos anos para avaliar diferentes efeitos tóxicos (GAGLIANO et al., 2005; RANALDI et al., 2006; CANO-SANCHO et al., 2015). O modelo baseado no metabolismo do nematoide *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) está se consolidando rapidamente, por sua eficácia em simular diferentes

patologias em nível molecular, especialmente o efeito das EROs (MIRANDA-VIZUETEA e VEAL, 2017). O uso do modelo *C. elegans* apresenta algumas vantagens em relação aos modelos convencionais como ratos, camundongos, coelhos, entre outros, incluindo sua facilidade de manipulação, seu curto ciclo de vida e seu sistema nervoso relativamente simples, o que o torna um modelo adequado também para estudos envolvendo questões biológicas relacionadas a neurobiologia (CORSI et al., 2015).

Diante deste contexto, este estudo se justifica pelo crescente apelo ao consumo de alimentos com efeitos benéficos a saúde, como é o caso dos vinhos. Embora os compostos fenólicos desses alimentos apresentem propriedades funcionais, é necessário avaliar a composição do alimento como um todo, levando em consideração a presença de possíveis contaminantes, como a OTA. Desta maneira, é possível avaliar a real contribuição das propriedades funcionais do vinho na saúde humana.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar o efeito da presença de OTA em vinho Cabernet Sauvignon sobre o perfil de compostos fenólicos, atividade antioxidante *in vitro*, bem como o efeito da presença da micotoxina no vinho sobre marcadores de danos oxidativos em *C. elegans*.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Verificar o efeito da adição de OTA no vinho tinto sobre o perfil de antocianinas, flavonols, ácidos fenólicos e estilbenos;

- Verificar a atividade antioxidante do vinho tinto após adição de OTA sob a geração dos radicais hidroxil e peroxil, oxidação da glutathione e remoção do radical ABTS.

- Avaliar o efeito de vinho adicionado de OTA sobre a taxa de sobrevivência, geração de EROs, lipoperoxidação (LPO) e expressão das enzimas antioxidantes endógenas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) em *C. elegans*.

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1 Produção e consumo de vinhos tintos finos**

Vinhos tintos finos são elaborados exclusivamente com uvas de variedades europeias (*Vitis viníferas*). No Brasil e, especialmente no Rio Grande do Sul, as uvas europeias (*Vitis vinífera*) representam 1/3 do total de uvas cultivadas. Dentre estas se destacam as uvas Cabernet Sauvignon, amplamente utilizadas na produção de vinhos com coloração intensa, riqueza em taninos e demais compostos fenólicos (ZOCCHÉ et al., 2017). De acordo com dados mais recentes da União Brasileira de Vitivinicultura, a produção brasileira de vinhos tintos finos entre janeiro e dezembro de 2018 alcançou os 38,71 milhões de litros, sendo a safra recorde de 52,20 milhões de litros em 2011 (IBRAVIN, 2018).

O consumo brasileiro anual de vinhos é de 2 litros por pessoa, o que equivale a um consumo diário de aproximadamente 5 mL (UVIBRA, 2017). Este consumo *per capita* de vinhos no Brasil leva o país a ocupar a 20ª posição no ranking de consumo mundial de vinhos. Portugal está no topo entre os países de maior consumo, com 54 litros por habitante. Em segundo lugar está a França com 51,8 litros, e a Itália com 41,5 litros. Entre os países da América do Sul, os destaques são a Argentina, com 31,6 litros *per capita*, e o Chile com 14,7 litros (IBRAVIN, 2018).

Estudos têm demonstrado que a ingestão diária de 200-300 mL para homens e 100-200 mL para mulheres pode auxiliar na prevenção de doenças cardiovasculares (BOBAN et al., 2016; WIN, 2017). Este volume de ingestão de vinho é baseado na concentração de álcool no sangue, bem como no papel dos componentes do vinho em neutralizar os efeitos prejudiciais do estresse oxidativo induzido pela exposição ao etanol (BOBAN et al., 2016).

#### **3.2 Compostos bioativos em vinhos**

O vinho tinto é uma bebida que contém minerais, apresentando em sua composição elevado teor de potássio (entre 634 mg L<sup>-1</sup> e 1519 mg L<sup>-1</sup>) e baixo teor de sódio (entre 1,4 mg L<sup>-1</sup> e 114 mg L<sup>-1</sup>), e em menores proporções cálcio, magnésio, ferro, cobre, zinco, entre outros (RIBEREAU-GAYON, et al., 2006).

As propriedades funcionais dos vinhos tintos se devem a presença de compostos fenólicos, cujo perfil depende da variedade de uva, das condições de cultivo e de

processamento, influenciando diretamente em seus parâmetros de qualidade, tais como sabor, cor, aroma e adstringência (SPAYD et al., 2002; JANNIN, 2004). A Tabela 1 apresenta a composição fenólica de vinhos Cabernet Sauvignon produzidos em algumas regiões do mundo.

**Tabela 1** – Composição fenólica de vinhos Cabernet Sauvignon em diferentes regiões.

<b>Compostos majoritários</b>	<b>Concentração (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Região</b>	<b>Referência</b>
Malvidina-3-O-glicosídeo	139,5	China	BAI et al., 2013
Ácido cafeico	6,15		
<i>Trans</i> -resveratrol	4,62		
Quercetina	8,81		
Malvidina-3-O-glicosídeo	264,32	Chile, Vale do Maipo	CÁCERES- MELLA et al., 2013
Catequina	32,03		
Quercetina	4,77		
Ácido cafeico	4,30		
Malvidina-3-O-glicosídeo	150,81	China, Chengdu, Província de Sichuan	LIU et al., 2016
Quercetina	4,69		
Catequina	62,89		
Ácido cafeico	37,44		
Catequina	46,91	China, Beijing	WU et al., 2017
Quercetina-3-O-glicosídeo	5,26		
Ácido gálico	16,57		
<i>Trans</i> -resveratrol	0,95		
Malvidina-3-O-glicosídeo	81,70	Argentina, Província de San Juan	LINGUA et al., 2016
Catequina	33,59		
Quercetina	42,03		
Ácido cafeico	19,14		

Os compostos fenólicos presentes na uva e em seus derivados apresentam diferentes efeitos benéficos à saúde, tais como: atividades antioxidante, anti-inflamatória, anti-microbiana e anticarcinogênica (COSTA DE CAMARGO et al., 2014). Estes compostos são

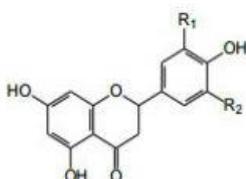
classificados como flavonóides (Figura 1) e não-flavonóides (Figura 2) (MITJANS et al., 2004).

O grupo dos flavonóides é integrado por flavanóis, flavonóis e antocianinas. No grupo dos não-flavonóides estão os ácidos fenólicos (hidroxibenzóico e hidroxicinâmicos) e os estilbenos. Considerando os diferentes tipos de vinhos, o conteúdo total de polifenóis é maior em vinhos tintos (cerca de 1,8 g L<sup>-1</sup>), enquanto que em vinhos brancos esses valores permanecem entre 0,2 e 0,3 g L<sup>-1</sup> (BERTELLI e DAS, 2009).

As catequinas e epicatequinas são flavanóis e estão presentes em maior quantidade nas sementes das uvas, e são as principais responsáveis pelo sabor e adstringência de vinhos (HOLLECKER et al., 2009). Estudos *in vivo*, utilizando o *C. elegans* têm demonstrado que a ingestão de catequinas (100 µM) atenua a geração de EROs induzida pela exposição a glicose (0,01 %) (DEUSING et al., 2015). Além disso, estes compostos podem formar ligações com açúcares, proteínas e lipídeos presentes no alimento, induzindo mudanças estruturais que podem prejudicar sua bioatividade (WINK, 2008; KIM, QUON e KIM, 2014).

---

#### Flavonóis



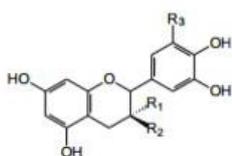
R<sub>1</sub> = H R<sub>2</sub> = H Kaempferol

R<sub>1</sub> = OH R<sub>2</sub> = H Quercetina

R<sub>1</sub> = OH R<sub>2</sub> = OH Miricetina

---

#### Flavanóis

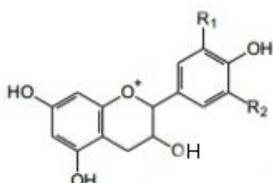


R<sub>1</sub> = OH R<sub>2</sub> = H R<sub>3</sub> = H (+)-catequina

R<sub>1</sub> = H R<sub>2</sub> = OH R<sub>3</sub> = H (-)-epicatequina

---

#### Antocianinas



R<sub>1</sub> = OH R<sub>2</sub> = H Cianidina

R<sub>1</sub> = OH R<sub>2</sub> = OH Delfinidina

R<sub>1</sub> = OCH<sub>3</sub> R<sub>2</sub> = H Peonidina

R<sub>1</sub> = OH R<sub>2</sub> = OCH<sub>3</sub> Petunidina

R<sub>1</sub> = OCH<sub>3</sub> R<sub>2</sub> = OCH<sub>3</sub> Malvidina

---

**Figura 1** – Estrutura química dos principais compostos flavonoides. Fonte: Adaptado de Ribéreau-Gayon et al., 2006.

As antocianinas são os compostos fenólicos mais abundantes em uvas tintas, e são responsáveis pela coloração azulada, violeta e vermelha, sendo compostos de extrema importância na produção de vinhos tintos (LÓPEZ et al., 2009). Estudos *in vitro* têm indicado que as antocianinas ( $10 - 55 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) podem reduzir a proliferação de células de câncer de cólon (HT-29) e mama (HER2) (HSU et al., 2012; LIU et al., 2013). Antocianinas ( $100 \text{ mg kg}^{-1}$  por dia) administradas na dieta de camundongos durante 28 dias também foram capazes de inibir a progressão do câncer de colón e de mama. Ambos os efeitos *in vitro* e *in vivo*, foram relacionados ao potencial antioxidante deste grupo de compostos fenólicos (GRIMES et al., 2018).

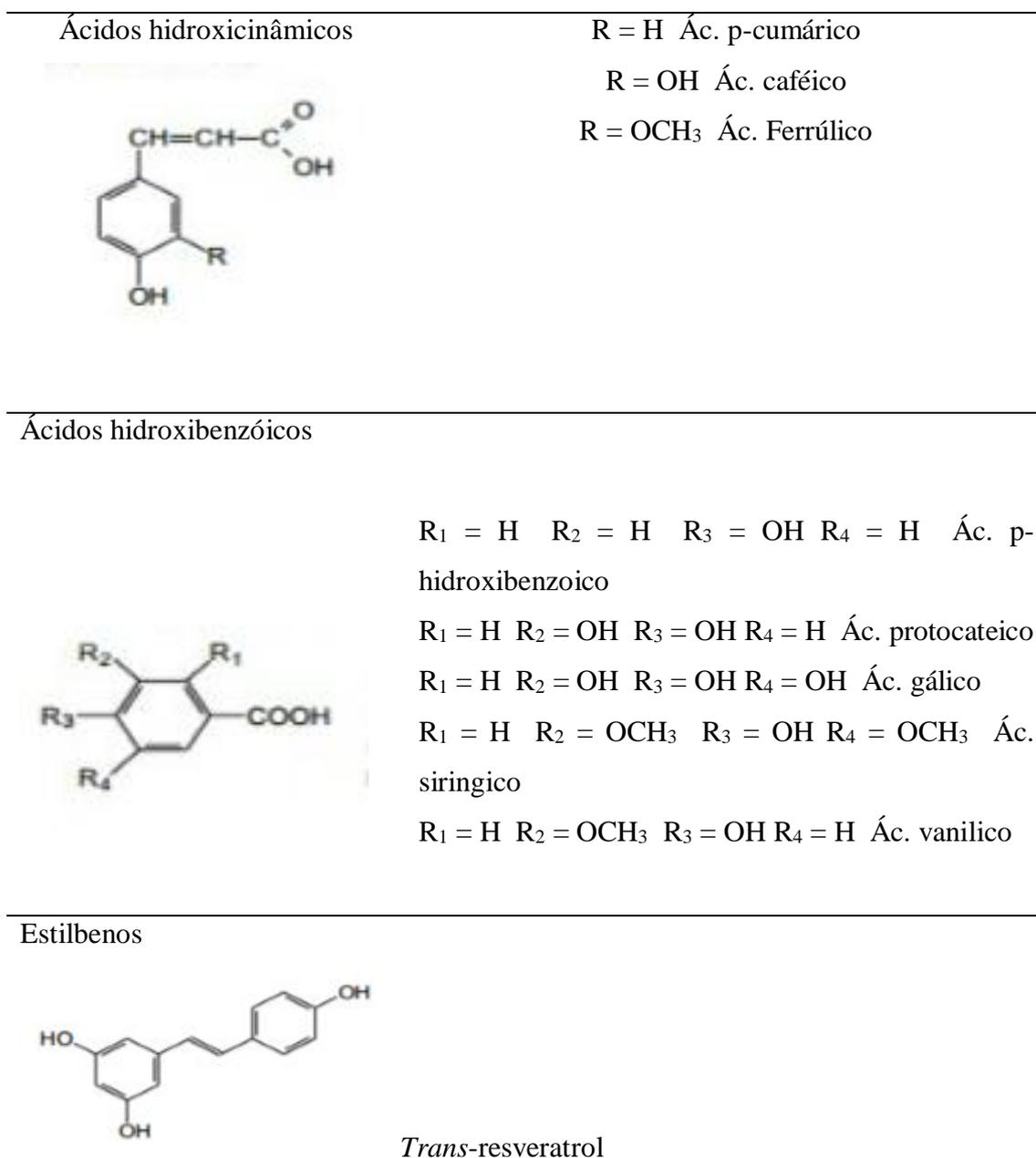
Quercetina, kaempferol e miricetina são flavonóis e atuam como co-pigmentos junto às antocianinas (HOLLECKER et al., 2009). Dentre os flavonóis, a quercetina tem sido amplamente estudada devido ao seu potencial antioxidante. Estudo em camundongos e em células intestinais (Caco-2) demonstraram que a quercetina ( $1,5 - 5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) possui boa eficiência de absorção intestinal (cerca de 63 % da quantidade ingerida é absorvida) (WANG et al. 2007; BEM et al., 2016). Além disso, a quercetina foi capaz de inibir a apoptose celular induzida pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$  em células do cólon humano (HT-29), através da regulação do sistema redox (BEM et al., 2016).

Os ácidos fenólicos possuem em sua estrutura um anel aromático substituído com pelo menos uma hidroxila e, podem ser classificados como ácidos hidroxicinâmicos ou hidroxibenzóicos (Figura 2). Nas uvas, os ácidos fenólicos geralmente apresentam-se ligados na forma de éster, éter e acetal a flavonoides ou ligados à estruturas insolúveis mais complexas como proteínas, taninos, celulose e lignina (ACOSTA-ESTRADA et al., 2014). Estes compostos estão presentes em menores quantidades em uvas tintas, porém são os principais constituintes de uvas brancas, influenciando o aroma e sabor desses vinhos (XI et al., 2012).

Os ácidos hidroxicinâmicos e hidroxibenzóicos têm sido alvo de diferentes estudos envolvendo mecanismos antioxidantes. Os ácidos *p*-cumárico ( $45 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e vanílico ( $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) possuem capacidade de reduzir a viabilidade de células de adenocarcinoma de colo humano (HT-29), além de induzir aumento na apoptose dessas células (TAI, SAWAMO e ITO, 2012; KILIÇ e YESILOGLU, 2013).

O resveratrol está presente em uvas e seus derivados, sendo um composto pertencente à classe dos estilbenos (MUÑOZ-ESPADA et al., 2004; XU et al., 2014). Estudos têm associado a presença de resveratrol em vinhos à redução na incidência de doenças

cardiovasculares e câncer, além de possível prevenção de doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson, diante de um consumo moderado dessa bebida (SUN et al., 2002; GIEHL et al, 2007; JANNIN et al., 2004).



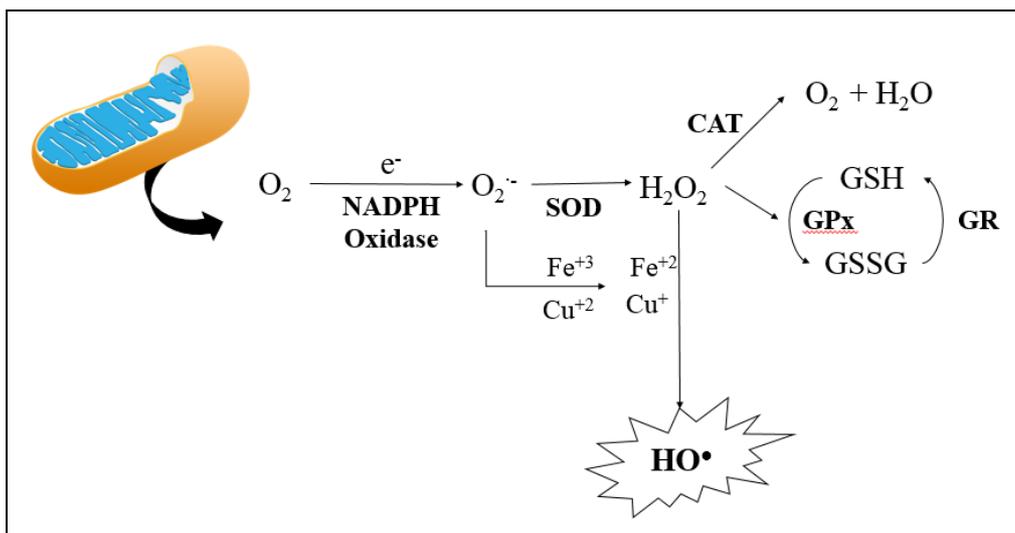
**Figura 2** – Estrutura química dos principais compostos não-flavonoides. Fonte: Adaptado de RIBÉREAU-GAYON et al., 2006.

Estes compostos podem atuar em organismos vivos retardando ou inibindo a oxidação de várias moléculas, inibindo a iniciação ou propagação de reações envolvidas na cadeia oxidativa. Isso ocorre pela atuação dos compostos fenólicos como agentes redutores, sequestradores de EROs e complexantes de metais. No entanto, o exato mecanismo envolvido no efeito antioxidante dos compostos fenólicos ainda não está totalmente compreendido, porém estudos têm destacado seu potencial de prevenir o estresse oxidativo (SUN et al., 2002; GIEHL et al, 2007; KILIÇ e YESILOGLU, 2013).

### **3.3 Estresse oxidativo**

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas naturalmente em organismos vivos, durante o metabolismo aeróbio primário nas mitocôndrias. Estes compostos têm importantes funções biológicas relacionadas aos processos de envelhecimento atuando, principalmente nas vias de sinalização dos processos de multiplicação e apoptose celular (ALVES et al., 2010). Entretanto, quando sua produção é exagerada ou há uma falha no sistema antioxidante, ocorre um desequilíbrio entre o sistema pró e antioxidante, conhecido como estresse oxidativo (BARREIROS, DAVID e DAVID, 2006). Tal desequilíbrio resulta em dano oxidativo devido ao ataque das EROs sobre macromoléculas como açúcares, DNA, proteínas e lipídios, podendo ocasionar apoptose irregular de células saudáveis. Entre as principais EROs estão oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ), radical ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), radical hidroxil ( $^{\bullet}\text{OH}$ ), peroxil ( $\text{RO}_2^{\bullet}$ ) e alcoxil ( $\text{RO}^{\bullet}$ ) (VASCONCELOS et al., 2007).

Para contrabalancear a produção de EROs, o organismo conta com defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas (Figura 3).



**Figura 3** – Esquema simplificado ilustrando o mecanismo de geração de EROs no interior das mitocôndrias, incluindo radical hidroxil ( $\bullet\text{OH}$ ), ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ); e ação dos antioxidantes enzimáticos endógenos em organismos vivos. SOD: superóxido dismutase; CAT: catalase; GPx: glutaciona peroxidase; GR: glutaciona redutase; GSH: glutaciona reduzida; GSSG: glutaciona oxidada. **Fonte:** Barreiros, David e David, 2006.

Com relação as defesas antioxidantes enzimáticas, as enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), correspondem a uma família de enzimas naturalmente presentes em organismos eucariotos. A SOD pode se apresentar no citosol, na forma de SOD-cobre-zinco, ou na mitocôndria como SOD-manganês. Sua principal função como enzima antioxidante é catalisar a dismutação do ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) em  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{O}_2$  em meio básico (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

A CAT é uma hemoproteína citoplasmática encontrada no sangue, medula óssea, mucosas, rins e fígado e sua principal função é a remoção do  $\text{H}_2\text{O}_2$  gerado intracelularmente (VASCONCELOS et al., 2007). O  $\text{H}_2\text{O}_2$  pode atuar como agente oxidante leve, uma vez que não possui capacidade de oxidar macromoléculas. No entanto, o efeito deletério do  $\text{H}_2\text{O}_2$  está relacionado a sua conversão para o radical hidroxil ( $\bullet\text{OH}$ ), seja por exposição à luz ultravioleta ou através da reação de Fenton. Na reação de Fenton o  $\text{H}_2\text{O}_2$  reage com o  $\text{Fe}^{2+}$  ou  $\text{Cu}^+$  formando o radical  $\bullet\text{OH}$  (ALVES et al., 2010).

Entre as defesas não enzimáticas, o organismo conta com diversos compostos, sendo a glutaciona reduzida (GSH) o principal antioxidante não-enzimático intracelular. A GSH desempenha um papel importante no metabolismo, atuando como agente redutor para que a enzima glutaciona peroxidase (GPx) catalise a redução do  $\text{H}_2\text{O}_2$  ou hidroperóxidos orgânicos à

água ou aos álcoois correspondentes, respectivamente (BRIGELIUS-FLOHÉ e MAIORINO, 2013).

Além da GSH, o organismo pode contar com compostos antioxidantes não enzimáticos exógenos, ou seja, consumidos através da dieta, como os compostos fenólicos e carotenoides. O potencial antioxidante de um determinado composto fenólico é dependente de sua estrutura, concentração e do tipo de EROs avaliada. Um dos principais fatores relacionados à capacidade antioxidante de compostos polifenólicos é o número de grupos hidroxila (OH), uma vez que quanto maior esse número, maior a capacidade antioxidante do composto (BARREIROS, DAVID e DAVID, 2006).

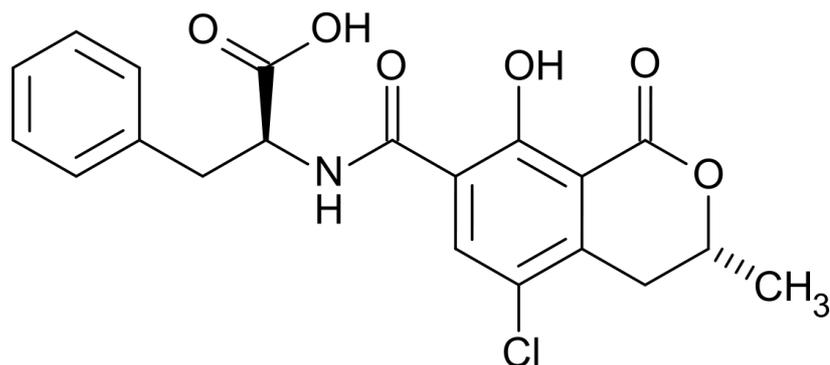
### **3.4 Contaminação fúngica e micotoxicológica de uvas e seus derivados**

Além de compostos bioativos, as uvas e seus produtos derivados podem conter metabólitos secundários chamados de micotoxinas. Diferentes fungos podem produzir estes compostos tóxicos, principalmente espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* (FREIRE et al., 2016). Tanto o desenvolvimento quanto o potencial toxigênico dos fungos podem ser afetados por fatores ambientais como temperatura, atividade de água (aw), pH, composição e disponibilidade de nutrientes (MEDINA et al., 2005). As uvas estão suscetíveis à contaminação fúngica nas diferentes etapas da cadeia produtiva, desde o cultivo até o armazenamento (FREIRE et al., 2017).

#### **3.4.1 Ocratoxina A**

A principal micotoxina encontrada em uvas e seus derivados é a ocratoxina A (OTA), isolada pela primeira vez a partir do *Aspergillus ochraceus* (VAN DER MERWE et al., 1965). A síntese da OTA ocorre, especialmente em níveis elevados de atividade de água, variando entre 0,95 a 0,99 e em uma ampla faixa de temperatura (15 a 35 °C) (AMÉZQUETA et al., 2012).

A OTA possui em sua estrutura (Figura 4) um derivado de policetídio com a porção diidroisocumarina ligada a porção carboxila da fenilalanina através de uma ligação amida (FREIRE et al., 2017). Além disso, em pH ácido ou neutro, a OTA é solúvel em solventes orgânicos polares (álcoois, cetonas, clorofórmio), pouco solúvel em água e insolúvel em éter de petróleo e hidrocarbonetos saturados (KHOURY e ATOUI, 2010).



**Figura 4** – Estrutura química da OTA. Fonte: VAN DER MERWE et al., 1965.

A OTA é cumulativa no organismo humano, com absorção relativamente rápida e eliminação lenta. Na maioria das espécies animais, a excreção da toxina se dá por via fecal e urinária, onde a contribuição de cada via depende da dose de exposição, do percentual de gordura corporal, da alimentação, do estilo de vida, do metabolismo, entre outros fatores. Na maioria das espécies, a OTA é absorvida no estômago devido a suas propriedades ácidas, sendo seu percentual de absorção variável entre 40 % e 66 %, dependendo da espécie avaliada. Além disso, esta micotoxina apresenta meia-vida biológica estimada em 127 h (RINGOT et al., 2006).

A OTA é considerada potencialmente nefrotóxica para mamíferos não ruminantes. Os principais relatos de sua nefropatia estão relacionados a Nefropatia Endêmica dos Balcãs (BEN), doença crônica fatal caracterizada por progressiva redução das funções renais em humanos ocorrida com populações das zonas rurais da antiga Jugoslávia, Romênia e Bulgária, em 1950 (KHOURY e ATOUI, 2010). A BEN é caracterizada pelo desenvolvimento de lesões no córtex renal, degeneração tubular, fibrose intersticial e hialinização do glomérulo. O avanço da doença pode resultar em redução do tamanho e peso dos rins, desenvolvimento de fibrose cortical que evolui para tumor maligno na uretra. O mecanismo de ação envolvido na toxicidade da OTA ainda não está completamente esclarecido, porém um dos principais mecanismos pode ser relacionado com a inibição da síntese de proteínas (NOGUEIRA e OLIVEIRA, 2006). Neste mecanismo o grupo fenilalanina da OTA compete com o aminoácido fenilalanina para o RNAt (ácido ribonucleico transportador) correspondente, inibindo a fenilalanina transferase e consequentemente a síntese proteica (NOGUEIRA e OLIVEIRA, 2006). Além de seus efeitos nefrotóxicos a OTA também apresenta efeitos carcinogênicos, teratogênicos, imunotóxicos e neurotóxicos (KHOURY e ATOUI, 2010).

A carcinogenicidade da OTA envolve diferentes mecanismos, onde os principais são: inibição da síntese proteica, disfunção mitocondrial, alteração da homeostase do cálcio, formação de adutos com o DNA e produção de EROs (MCLAUGHLIN et al., 2004; MARINKUAN et al., 2008; BOUAZIZ et al., 2008). Pesquisas demonstrando o potencial tóxico da OTA em animais, levaram a Agência Internacional de Pesquisas do Câncer (IARC) a classificá-la no grupo 2B, como possivelmente cancerígena para humanos (IARC, 1993).

A OTA apresenta alta estabilidade, assim uma vez que o alimento é contaminado, torna-se muito difícil removê-la totalmente e evitar sua ação tóxica no organismo. Além disso, esta micotoxina pode resistir a três horas de esterilização a 121 °C, e mesmo a 250 °C por 20 min, a destruição da toxina não se dá por completa. Porém, a degradação é favorecida em baixos teores de umidade (> 0,80) e em presença de hipoclorito de sódio (KHOURY e ATOUI, 2010).

A toxicidade e ocorrência frequente de OTA em uvas e seus derivados (Tabela 2), levou vários países a estabelecerem limite máximo tolerável (LMT). No Brasil, o LMT de 2 µg L<sup>-1</sup> é estabelecido para OTA em vinhos e sucos de uva pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) através da RDC nº 59 de 2011 (BRASIL, 2013). Este limite também é indicado pela União Europeia (EUROPEAN COMMISSION, 2006) e Departamento de Agricultura, Alimentos e Nutrição dos Estados Unidos (USDA, 2017).

Um dos principais mecanismos responsáveis pelos diferentes efeitos tóxicos da OTA é a indução de estresse oxidativo (TAO et al., 2018). A exposição à OTA, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, resulta em aumento na geração de EROs, que pode ser contrabalanceado em presença de compostos antioxidantes (SCHAAF et al., 2002; TAO et al., 2018). Estes estudos consideram como principal mecanismo de geração de EROs a ativação metabólica da OTA por peroxidases, produzindo um radical fenoxil derivado da OTA. Em presença de GSH, este radical pode ser novamente convertido em OTA, tendo como resultado a formação do radical O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Este radical forma H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que pode induzir a geração de radicais <sup>•</sup>OH via reação de Fenton, causando danos oxidativos às proteínas, lipídeos e DNA (EL ADLOUNI et al., 2000). A exposição de células tubulares renais de ratos (LLC-PK1) a OTA (3 – 100 µM) levou ao aumento na geração de EROs e consequente redução nos níveis celulares de GSH dependente da dose avaliada, indicando que o estresse oxidativo induzido pela OTA contribui para a toxicidade tubular (SCHAAF et al., 2002).

**Tabela 2** – Ocorrência de ocratoxina A em vinhos produzidos em alguns locais do mundo.

Local	N*	OTA ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Referência
Turquia	51	0,006 – 0,158	VAR e KABAK, 2007
Tessália (Grécia)	60	0,04 – 2,52	SARIGIANNIS et al., 2014
Rioja Alavessa (Espanha)	100	0,004 – 0,179	QUINTELA et al., 2011
Espanha	51	0,016 – 0,142	REMIRO et al., 2012
Chile	1188	0,01 – 0,35	VEGA et al., 2012
Morávia (Europa central)	72	0,0012 – 0,071	MIKULÍKOVÁ et al., 2012
Sicília	40	0,081 – 0,71	GENTILE et al., 2016
Argentina	1401	0,15 – 3,60	OTEIZA et al., 2017
Croácia	26	0,01 – 0,24	VITALI et al., 2018
Brasil (Rio Grande do Sul)	34	0,01 – 4,50	WELKE et al., 2010

\* Número de amostras analisadas.

A OTA pode também atuar como mediadora de dano oxidativo, em especial dano a lipídeos e proteínas uma vez que esta micotoxina tem capacidade de formar complexos com  $\text{Fe}^{3+}$ . Em mamíferos, o complexo OTA- $\text{Fe}^{3+}$  é facilmente reduzido pelas enzimas do citocromo P450 à OTA-  $\text{Fe}^{2+}$ , que desencadeia a geração de EROs, em especial o radical  $\bullet\text{OH}$  (TAO et al., 2018).

Além disso, o estresse oxidativo resultante da exposição a OTA pode alterar as defesas antioxidantes do organismo, uma vez que o aumento na geração de EROs pode afetar a expressão de enzimas antioxidantes endógenas, como CAT, GPx e SOD (KÖSZEGI e POÓR, 2016; TAO et al., 2018). Enciso et al. (2018) observaram um aumento na geração de EROs e na expressão de SOD em ratos expostos a OTA ( $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$  por dia) ao longo de 21 dias. A exposição de camundongos ao longo de 60 dias a OTA ( $120 \mu\text{g kg}^{-1}$  por dia) resultou em apoptose celular, mediada pelo estresse oxidativo. Neste estudo, o efeito tóxico da OTA foi resultante do aumento da peroxidação lipídica e redução na atividade da SOD (PETRIK et al., 2003).

### 3.5 Efeito de compostos bioativos sobre o potencial tóxico da OTA

A ingestão de alimentos consiste em uma importante via de exposição a diferentes contaminantes para humanos (SUN et al., 2002). Uma vez que derivados da uva podem conter OTA e compostos bioativos, torna-se importante avaliar a interação entre estas substâncias.

Poucos estudos disponíveis na literatura têm avaliado o efeito resultante da exposição concomitante de micotoxinas e compostos bioativos (Tabela 3) (DOI e UETSUKA, 2011; CANO-SANCHO et al., 2015; PRATIKSHA et al., 2016; PARADELLS et al., 2015).

**Tabela 3** – Estudos avaliando os principais efeitos da co-exposição entre OTA e compostos fenólicos/vinho tinto em diferentes modelos experimentais.

<b>Composto fenólico</b>	<b>Modelo</b>	<b>Principal resultado</b>	<b>Referência</b>
$\alpha$ -tocoferol	Células mamárias bovinas	Redução de citotoxicidade	BALDI et al., 2004
Galato de epicatequina	Células de camundongos	Redução de geração de EROs	COSTA et al., 2007
Cianidina-3-O- $\beta$ -D-glicosídeo	Ratos	Redução da geração de EROs	CORCUERA et al., 2012
Vinho tinto Barbera	Camundongos	Redução de nefrotoxicidade	GAGLIANO et al., 2005
Vinho tinto Barbera	Células intestinais	Aumento de apoptose celular	RANALDI et al., 2006
Vinho tinto Barbera	Ratos	Redução dos níveis de GSH e aumento da peroxidação lipídica	ALBERTO et al., 2005
Resveratrol	Células intestinais	Aumento da citotoxicidade	CANO-SANCHO et al., 2015

O  $\alpha$ -tocoferol é um composto do grupo da vitamina E que é caracterizado como um potente antioxidante. Células mamárias bovinas (BME-UV1) pré-incubadas por 3 horas com  $\alpha$ -tocoferol ( $0,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) demonstraram redução da citotoxicidade induzida pela OTA ( $4,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), através da redução na geração de EROs, resultando em aumento da viabilidade celular (BALDI et al., 2004).

As catequinas são compostos fenólicos encontrados especialmente em chás verdes, que também apresentam elevado potencial antioxidante. A exposição de células de camundongos (LLC-PK1) a OTA ( $15 \mu\text{M}$ ), após pré-tratamento de 24 horas com galato de epicatequina ( $60 \mu\text{M}$ ) demonstrou que esta catequina possui habilidade de reduzir a geração de EROs induzida pela OTA. Além disso, o galato de epicatequina foi capaz de proteger o

DNA das células da fragmentação induzida pela OTA, o que resultaria em morte celular (COSTA et al., 2007).

A cianidina-3-O- $\beta$ -D-glicosídeo (C3G), uma antocianina presente em larga escala na dieta humana, em especial em derivados de uvas como o vinho tinto, tem sido estudada devido ao seu potencial como antioxidante. A administração oral de C3G ( $1 \text{ g kg}^{-1}$ ) em ratos durante 28 dias de exposição a OTA ( $0,2 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ ) indicou que esta antocianina é capaz de reduzir a geração de EROs mediada pela presença de OTA (CORCUERA et al., 2012).

No entanto, atualmente existem poucos trabalhos, avaliando a exposição concomitante a OTA e diferentes constituintes dos alimentos. Estudo com camundongos que receberam ao longo de 90 dias  $0,5 \text{ mL}$  de vinho tinto contendo o equivalente a  $289 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$  de OTA, demonstrou o efeito protetor dos compostos fenólicos presentes do vinho na redução da fibrose renal induzida pela exposição a OTA. Esse efeito protetor se deve a redução da multiplicação e apoptose das células tubulares renais, além de aumento do reparo celular em presença do vinho (GAGLIANO et al., 2005).

Entretanto, Ranaldi et al. (2006) mostraram que células Caco-2 expostas a vinho tinto na presença de OTA ( $100 \text{ } \mu\text{M}$ ) apresentaram aumento da apoptose celular. Por outro lado, ao avaliar a co-exposição de OTA ( $40 \text{ } \mu\text{M}$ ) e resveratrol ( $100 \text{ } \mu\text{M}$ ), Cano-Sancho et al. (2015) verificaram uma exacerbação da citotoxicidade causada pela OTA. Esses resultados indicam a necessidade de estudos adicionais sobre a interação da OTA com os componentes específicos do vinho tinto, buscando compreender os mecanismos relacionados ao aumento de sua toxicidade e possível efeito protetor dos compostos presentes nos vinhos (RANALDI et al., 2006; CANO-SANCHO et al., 2015).

### **3.6 Métodos para determinação de danos oxidativos *in vitro* e *in vivo***

A avaliação do estresse oxidativo em organismos vivos tem se baseado na quantificação da geração de EROs, na avaliação do perfil antioxidante (enzimático e não-enzimático) e determinação de produtos formados durante o ataque dessas espécies a biomoléculas. Os principais compostos resultantes do ataque de EROs são derivados de processos como a despolimerização de polissacarídeos e ácidos nucleicos, oxidação de grupamentos sulfídricos de proteínas ou peroxidação de lipídeos (LPO) (BACK et al., 2012).

O método de avaliação do conteúdo de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) é amplamente utilizado para estimar o grau de LPO, sendo baseado na reação do ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) com o malondialdeído (MDA), principal produto da LPO. O

MDA gerado, em condições de temperatura e acidez elevadas, reage com o TBA formando um cromogênio, que pode ser medido por espectrofotometria (KEN et al., 2003).

O método da diclorofluoresceína (DCF) é utilizado na avaliação da geração de EROS. A estimativa da geração de EROs é realizada com base na fluorescência da 2'-7'-diacetato diclorofluoresceína (DCFH-DA), que em presença de EROs é oxidado a DCF. O DCFH-DA apresenta facilidade de oxidação por diferentes grupos funcionais, e tem sido utilizado para caracterizar quantitativamente espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ZHAO e RIEDIKER, 2014).

Com relação aos ensaios *in vitro* para a determinação da atividade antioxidante, estão disponíveis na literatura métodos envolvendo diferentes princípios e EROs, tais como o método do ABTS ([2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico]), método da capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC, *oxygen radical absorbance capacity*), método da 2-desoxirribose e método de oxidação da GSH (LIMA et al., 2015).

A determinação da atividade antioxidante pelo método ABTS<sup>•+</sup> consiste em monitorar a redução da concentração do cátion ABTS<sup>•+</sup>, após adição de amostra contendo antioxidantes (RE et al., 1999). Uma das principais vantagens da utilização do método é a boa solubilidade do ABTS<sup>•+</sup>, tanto em água quanto em solventes orgânicos, permitindo a análise de amostras hidrofílicas e lipofílicas (ROGINSKI e LISSI, 2005; KUSKOSKI et al., 2005; ARNAO, 2000).

O método da ORAC é utilizado para avaliar a atividade antioxidante de um determinado composto contra a oxidação induzida pelo radical peroxil (RO<sub>2</sub><sup>•</sup>). Neste ensaio, o RO<sub>2</sub><sup>•</sup> é gerado pela reação do dicloreto de 2,2'-azobis(2-amidinopropano) (AAPH) com oxigênio atmosférico. A extensão do dano causado pelas espécies reativas geradas é mensurado através de espectrofotometria, através da queda na fluorescência de uma sonda sintética, a fluoresceína (HUANG, OU e PRIOR, 2005). No entanto, em presença de compostos antioxidantes, o radical RO<sub>2</sub><sup>•</sup> reagirá com o antioxidante, mantendo a fluorescência do indicador. Assim, quanto menor o decaimento da fluorescência do indicador, maior o potencial antioxidante do composto testado (ALVES et al., 2010).

O método que utiliza 2-desoxirribose é utilizado para determinar a capacidade de compostos sequestrarem o radical hidroxil gerado através da reação de Fenton. O radical formado reage com 2-desoxirribose formando compostos que, após aquecimento, em presença de TBA e pH baixo, apresentam coloração rosada. Substâncias que tenham propriedades antioxidantes podem competir com a 2-desoxirribose pelo radical, resultando na redução da intensidade de cor (HALLIWEL et al., 1987).

A GSH é o antioxidante não-enzimático mais abundante no meio intracelular e sua capacidade redutora se deve ao grupamento –SH presente na cisteína. No método de oxidação da GSH, ao reagir com substâncias oxidantes como o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a GSH é convertida em glutatona oxidada (GSSG) e a redução dos grupos sulfidrilícos pode ser avaliada por espectrofotometria (SOUSA et al., 2006).

Em função dos diferentes radicais livres e dos diferentes alvos de oxidação, dificilmente haverá um único ensaio de atividade antioxidante que seja capaz de representar de maneira segura e precisa, a real atividade antioxidante de determinado composto. Isto se deve ao fato de que a atividade antioxidante depende não somente da reatividade química do antioxidante, mas também de sua interação com outros componentes. A avaliação correta da atividade antioxidante em matrizes alimentares e sistemas biológicos deve ser baseada em modelos individuais que representem as mesmas condições químicas, físicas e ambientais esperadas para o sistema em análise (ALVES et al., 2010).

### **3.7 Modelo alternativo ao uso de animais de experimentação - *Caenorhabditis elegans***

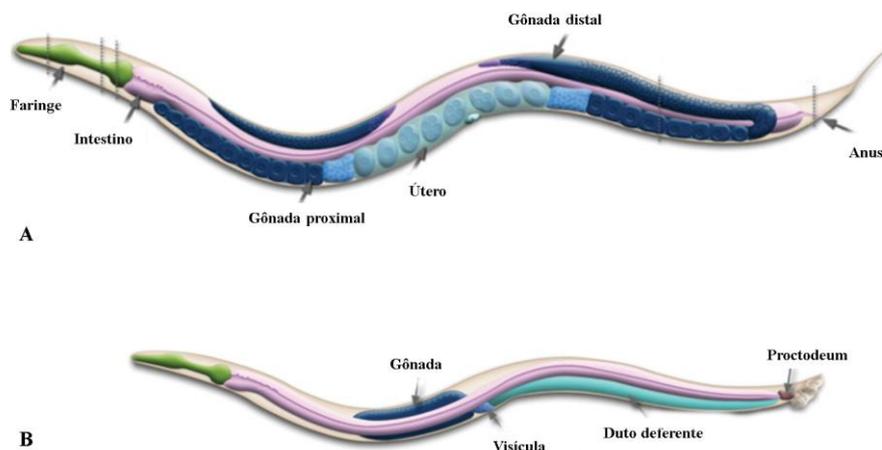
O uso de animais em experimentos relacionados a toxicologia tem sido razão de muitas discussões, em função do número de animais utilizados e do sofrimento causado. Neste contexto há uma tendência mundial de se reavaliar a utilização de animais nos experimentos, baseada no princípio dos 3R's (*Reduction, Refinement, Replacement*, do inglês: Redução, Refinamento, Substituição), que busca, diminuir o número de animais utilizados, minimizar a dor e o desconforto e buscar alternativas para a substituição dos testes *in vivo* (CAZARIN et al., 2004).

Entre os modelos alternativos utilizados para avaliar a interação entre os constituintes dos alimentos e seus possíveis contaminantes, bem como seus efeitos no organismo humano, o modelo utilizando o nematoide *C. elegans* está se consolidando rapidamente por sua eficácia em simular diferentes patologias em nível molecular, especialmente o efeito das EROs (MIRANDA-VIZUETEA e VEAL, 2017).

O uso do modelo *C. elegans* apresenta algumas vantagens em relação aos modelos convencionais, incluindo sua facilidade de manipulação, seu curto ciclo de vida e seu sistema nervoso relativamente simples, o que o torna um modelo adequado também para estudos envolvendo questões biológicas relacionadas a neurobiologia (CORSI et al., 2015). Além disso, a facilidade de manipulação das suas condições de crescimento estabeleceu *C. elegans*

como um modelo para o estudo da imunidade e envelhecimento (CORSI et al., 2015; PUN et al., 2010; AMIRA et al., 2016).

A estrutura corporal do verme adulto de aproximadamente 1 mm é anatomicamente simples, com cerca de 1000 células somáticas. O nematoide se reproduz em cerca de 3 dias sob condições ótimas (20 °C), e pode ser mantido em placas contendo Meio de Crescimento de Nematoide (NGM) e *Escherichia coli* como alimento. O *C. elegans* se apresenta com dois sexos: um hermafrodita autofertilizante (XX) e um macho (XO) (Figura 5). Os machos se apresentam em menor número e podem surgir espontaneamente pela linha germinativa hermafrodita (0,1 %) ou através de acasalamento (até 50 %). A autofertilização do hermafrodita permite que os vermes homozigotos gerem prole geneticamente idêntica, e o acasalamento masculino facilita o isolamento e a manutenção de cepas mutantes (BRENNER, 1973).

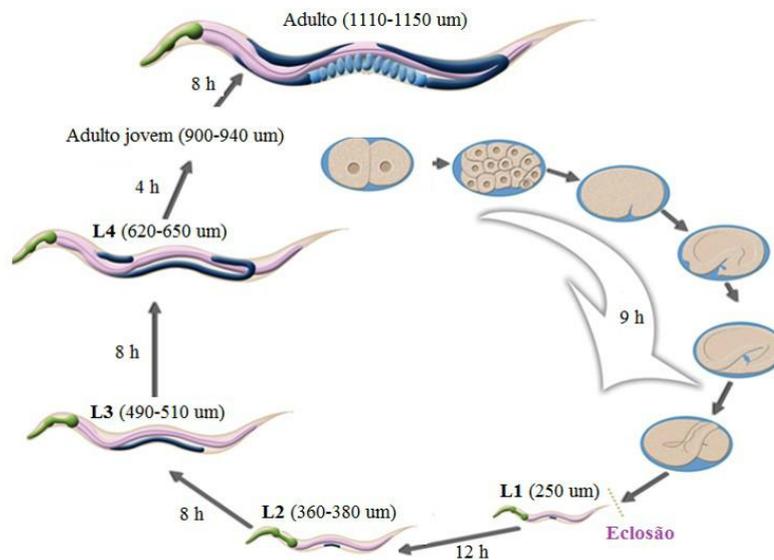


**Figura 5** – Estrutura corporal de um verme adulto hermafrodita (A) e macho (B). **Fonte:** Wormatlas, 2019.

Apesar de sua anatomia simples, o nematoide exibe locomoção; alimentação; defecação; colocação de ovos; respostas sensoriais ao toque, olfato, paladar e temperatura; e alguns comportamentos complexos como acasalamento masculino, comportamento social, aprendizado e memória (RANKIN, 2002; DE BONO, 2003).

O ciclo de vida do *C. elegans* é composto pelo estágio embrionário, quatro estágios larvais (L1 - L4) e idade adulta (Figura 6). O estágio embrionário é dividido em duas etapas: (1) proliferação e (2) organogênese/morfogênese. A proliferação ocorre entre 330-350 minutos após a fertilização à 22 °C e o estágio de organogênese/morfogênese é verificado após 5,5 horas decorridas da fertilização, e pode durar de 12 a 14 horas. A estrutura corporal

do verme está completamente estabelecida logo ao fim da embriogênese (SULSTON et al., 1983).



**Figura 6** – Ciclo de vida do *C. elegans* a 20 °C na fase embrionária, nos estágios larvais (L1-L4) e na fase adulta. **Fonte:** Wormatlas, 2019.

O desenvolvimento pós-embriônico é desencadeado através da alimentação após a eclosão dos ovos, e os vermes normalmente passam por quatro fases larvais para atingir a idade adulta. Durante o primeiro estágio larval (L1) ocorre o desenvolvimento do sistema nervoso e reprodutivo. Durante o estágio L2 a divisão celular é reduzida e o verme pode entrar em estado de parada chamado “dauer”. A formação do estágio “dauer” ocorre em condições ambientais não favoráveis (presença de um feromônio, ausência de alimento e alta temperatura) para o crescimento do nematoide. Neste estágio *C. elegans* não envelhece e a alimentação é interrompida indefinidamente e a locomoção é marcadamente reduzida, impedindo a formação do estágio larval L3 (SULSTON, 1988).

Nos estágios L3 e L4 ocorre o desenvolvimento final do sistema reprodutivo dos nematoides. Aproximadamente 45 a 50 horas após a eclosão dos ovos, a 20 °C, os vermes atingem a fase adulta, onde o hermafrodita recentemente desenvolvido deposita seus primeiros ovos, completando assim seu ciclo de vida reprodutivo de 3 dias (CORSI et al., 2015).

### 3.8 Uso de *C. elegans* na avaliação da toxicidade de micotoxinas

O *C. elegans* é um modelo que tem se consolidado para avaliação do efeito de diferentes compostos oriundos da dieta humana, sobre o metabolismo vivo. Estes compostos incluem tanto os compostos benéficos quanto contaminantes alimentares, como as micotoxinas (Tabela 4).

**Tabela 4** – Efeito de micotoxinas em presença/ausência de compostos bioativos sobre *C. elegans*.

Micotoxina	Composto bioativo	Principal resultado	Referência
Aflatoxina B1, fumonisina B1, deoxinivalenol, zearalenona e toxina T-2	-	Inibição do crescimento e reprodução	YANG et al., 2015
Aflatoxina B1	-	Danos ao DNA, citotoxicidade, inibição de crescimento e reprodução	FENG et al., 2017
Aflatoxina B1	-	Danos ao DNA	LEUNG et al., 2010
Penitrem A	Astaxantina	Efeito neuroprotetor em presença da micotoxina	AMIRA et al., 2016

A avaliação dos efeitos tóxicos de diferentes micotoxinas através de exposição individual em concentrações que variaram de 0 a 8 mg L<sup>-1</sup> (aflatoxina B1, deoxinivalenol, fumonisina B1, toxina T-2 e zearalenona) sobre o crescimento, reprodução e tempo de vida do *C. elegans* indicou que as cinco micotoxinas contribuíram para a redução do seu tempo de vida. O crescimento do nematoide foi mais sensível a aflatoxina B1 e sua reprodução mostrou-se mais sensível aos efeitos tóxicos da fumonisina B1 (YANG et al., 2015).

A exposição do *C. elegans* à aflatoxina B1 induziu danos ao DNA, resultando em citotoxicidade e inibição do crescimento e reprodução do *C. elegans* (FENG et al., 2017). Pesquisa semelhante indicou danos ao DNA do nematoide após exposição a aflatoxina B1.

Neste caso, os danos foram atribuídos a deficiência do metabolismo enzimático de biotransformação, mediado pelas enzimas do citocromo P450 (LEUNG et al., 2010).

Além dos efeitos tóxicos induzidos por diferentes micotoxinas no *C. elegans*, estudos têm avaliado o efeito de compostos antioxidantes sobre o tempo de vida do nematoide. Antioxidantes como as vitaminas E (HARRINGTON e HARLEY, 1988) e C (BROWN et al., 2006) e N-acetilcisteína (PUN et al., 2010) podem afetar de diferentes formas o tempo de vida de *C. elegans*, exercendo influência sobre sua resistência ao estresse oxidativo (HARRINGTON e HARLEY, 1988; COLLINS et al., 2006; BROWN et al., 2006; PUN et al., 2010). Um estudo relatou que os derivados sintéticos de estilbenos, *trans*-3,5-dimetoxi-4-fluor-4'-hidroxiestilbeno e *trans*-2,4',5-trihidroxiestilbeno (100 µM) mostraram eficiência em aumentar o tempo de vida do *C. elegans* quando comparados ao resveratrol (100 µM) (FISCHER et al., 2017). Um estudo evidenciou o efeito neuroprotetor do carotenóide astaxantina isolada (AST) quando *C. elegans* foram expostos à Penitrem (PA), uma micotoxina produzida por espécies marinhas de *Penicillium* (AMIRA et al., 2016).

Desta maneira, a presença de compostos bioativos em alimentos poderia contribuir para uma melhora no metabolismo do *C. elegans* (DEUSING et al., 2015), ou, contrariamente, poderia exacerbar a resposta negativa de contaminantes como as micotoxinas. Além dos estudos sobre efeito de micotoxinas e/ou efeitos protetores de compostos bioativos em *C. elegans* serem escassos, nenhum estudo foi desenvolvido avaliando a relação de compostos bioativos do vinho tinto com os danos oxidativos causados por OTA neste modelo vivo.

Diante deste contexto, este trabalho se justifica pelo crescente apelo ao consumo de alimentos com efeitos benéficos a saúde, como é o caso dos vinhos. Embora os constituintes desses alimentos apresentem propriedades funcionais, é necessário avaliar a composição do alimento como um todo, levando em consideração a presença de possíveis contaminantes. Além disso, é de extrema importância avaliar a interação entre estes constituintes e os contaminantes, bem como seus efeitos potenciais no organismo humano, garantindo assim as propriedades funcionais e a segurança do alimento.

#### **4. APRESENTAÇÃO**

As metodologias utilizadas neste estudo e resultados obtidos serão apresentados na forma de manuscrito em preparação para submissão ao Periódico **Food and Chemical Toxicology**.

## 5. MANUSCRITO

### **OCHRATOXIN A PRESENCE IN CABERNET SAUVIGNON WINE CHANGES PHENOLIC COMPOUNDS PROFILE AND OXIDATIVE STRESS MARKERS IN VITRO AND IN VIVO**

Luana Schmidt <sup>1</sup>, Natália de Vargas Heck <sup>1</sup>, Ingrid Ferreira <sup>2</sup>, Gabriela Göethel <sup>2</sup>, Sabrina Somacal <sup>3</sup>, Tatiana Emanuelli<sup>3</sup>, Eliseu Rodrigues <sup>1</sup>, Solange Cristina Garcia <sup>2</sup>, Juliane Elisa Welke <sup>1</sup>, Paula Rossini Augusti <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Food Science and Technology, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500, Campus do Vale, Porto Alegre, CEP 91501-970, RS, Brazil.

<sup>2</sup> Laboratory of Toxicology (LATOX), Department of Analyses, Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Ipiranga, 2752, Porto Alegre, CEP 90610-000, RS, Brazil.

<sup>3</sup> Integrated Nucleus of Development in Laboratory Analysis (NIDAL), Department of Technology and Food Science, Center of Rural Sciences, Federal University of Santa Maria (UFSM), Av. Roraima, 1000, Santa Maria, CEP 97105-900, RS, Brazil.

Author to whom correspondence should be addressed.

E-mail: paularaugusti@gmail.com; Phone: +55-51-3308-6676

*Running title:* Ochratoxin A and red wine antioxidant potential

## 6. DISCUSSÃO GERAL

O crescente apelo ao consumo de alimentos ricos em compostos bioativos tem despertado o interesse em estudos envolvendo o efeito destes compostos e sua possível interação com os contaminantes presentes. O vinho Cabernet Sauvignon é um dos vinhos mais consumidos mundialmente e se destaca por sua rica composição fenólica, que contribui para suas propriedades funcionais e sensoriais (SUN et al., 2002; SARUBBO et al, 2017).

O teor total de compostos fenólicos do vinho tinto foi maior ( $p \leq 0,05$ ) no vinho sem OTA (23441,31 mg L<sup>-1</sup>) quando comparado ao vinho em presença de OTA (5822,85 mg L<sup>-1</sup>). O vinho tinto Cabernet Sauvignon utilizado neste estudo apresentou uma variada composição fenólica, sendo identificados e quantificados 23 compostos (11 antocianinas, 3 flavonols, 7 ácidos fenólicos e 2 derivados estilbenos). O vinho tinto livre de OTA apresentou  $7580,67 \pm 3,35$  mg L<sup>-1</sup> de antocianinas totais, representadas majoritariamente pela delphinidina-3-glicosídeo, malvidina-3-glicosídeo, delphinidina-3-acetilglicosídeo e malvidina-3-acetilglicosídeo. O conteúdo total de ácidos fenólicos e flavonols neste vinho foi de  $2752,56 \pm 1,01$  mg L<sup>-1</sup> e  $13108,06 \pm 1,23$  mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. Os ácidos fenólicos majoritários foram os ácidos cafeico e caftarico, enquanto que os maiores representantes dos flavonols foram a quercetina-3-*O*-glucuronídeo e laricitrina-3-*O*-glicosídeo. Embora os derivados estilbenos tenham sido identificados (*trans*-resveratrol e *trans*-piceído) foram detectados em baixos níveis no vinho livre de OTA, em concentrações variando entre 0,005 e 0,01 mg L<sup>-1</sup>. No vinho tinto em presença de OTA, os derivados de estilbenos não foram detectados ( $< 0,005$  mg L<sup>-1</sup>). Esse resultado corrobora com o que vem sendo discutido na literatura, onde o *trans*-resveratrol aparece em pequenas quantidades em vinhos tintos: 4,62 mg L<sup>-1</sup> (BAI et al., 2013), 0,32 mg L<sup>-1</sup> (XU et al., 2014) e 0,95 mg L<sup>-1</sup> (WU et al., 2017), quando comparados aos demais compostos fenólicos presentes nesta bebida.

A presença de OTA no vinho tinto nas três concentrações avaliadas reduziu o conteúdo de antocianinas, flavonols e ácidos fenólicos ( $p \leq 0,05$ ). A diminuição dos níveis de compostos fenólicos no vinho adicionado de OTA pode estar associada a formação de ligações entre OTA e estes compostos. Esse tipo de interação já foi relatada para compostos fenólicos do chá verde e Aflatoxina B1 (AFB1), onde 85 % dos compostos fenólicos formaram complexo com a AFB1 (LU et al., 2016). No entanto, este é o primeiro estudo avaliando a interação de compostos fenólicos do vinho tinto com a OTA.

O potencial antioxidante e os efeitos benéficos do vinho tinto estão associados à presença de compostos fenólicos, uma vez que antocianinas, flavonols e ácidos fenólicos auxiliam na remoção de EROs (LOIZZO et al., 2011). O vinho tinto utilizado neste estudo apresentou elevado potencial antioxidante em ausência de OTA ( $p < 0,05$ ), demonstrado pelos ensaios antioxidantes da GSH, ABTS, 2-desoxirribose e ORAC.

O potencial antioxidante avaliado através dos métodos ORAC e ABTS não foi afetado ( $p \geq 0,05$ ) pela presença de OTA (1, 2 e 4  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) no vinho. Ambos métodos utilizam compostos sintéticos para avaliar o potencial antioxidante (ABTS e AAPH). Por outro lado, os ensaios da desoxirribose e da oxidação da GSH mimetizam *in vitro* o que aconteceria *in vivo*, apresentando resultados mais expressivos (KUSKOSKI et al., 2005). A geração do radical hidroxil ( $\bullet\text{OH}$ ) e a redução no conteúdo de GSH foi superior ( $p < 0,05$ ) no vinho adicionado de OTA. A redução no conteúdo de todos os grupos de compostos fenólicos avaliados no vinho em presença de OTA está fortemente relacionada ( $r = -0,94$  para 1  $\mu\text{g L}^{-1}$  de OTA e  $r = -1$  para 2 e 4  $\mu\text{g L}^{-1}$  de OTA) com o aumento na geração do radical  $\bullet\text{OH}$  e redução do conteúdo de GSH ( $r = 0,89$  para 1  $\mu\text{g L}^{-1}$  de OTA e  $r = 1$  para 2 e 4  $\mu\text{g L}^{-1}$  de OTA).

Os menores níveis de compostos fenólicos no vinho adicionado de OTA resultaram em perdas do potencial antioxidante, uma vez que os menores níveis destes compostos reduzem a taxa de remoção de radicais  $\bullet\text{OH}$ , gerados via reações de Fenton (KURIN, MUCAJI e NAGY, 2012). Em organismos vivos, a GSH é o antioxidante não-enzimático mais abundante em nível celular, e desempenha um papel importante nos processos de desintoxicação do organismo, eliminando ou reduzindo a toxicidade de compostos, como OTA (VASCONCELOS et al., 2007; RINGOT et al., 2006). Estudo *in vivo* avaliando a exposição de ratos (1-14 dias) à OTA (289  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ) indicou que a OTA diminuiu o conteúdo de GSH no tecido renal e essa diminuição foi evitada pela administração de vinho tinto (ALBERTO et al., 2005).

O mecanismo de toxicidade da OTA em sistemas biológicos ainda não é totalmente compreendido, mas sabe-se que o estresse oxidativo está envolvido, através da formação de diferentes EROs (ABDEL-HALEEM et al., 2016; ABDEL-WAHHAB et al., 2017; COSTA et al., 2017). A presença de OTA no vinho tinto afetou os marcadores de estresse oxidativo ( $p < 0,05$ ) em *C. elegans*, porém, não afetou sua sobrevivência quando comparado ao vinho tinto em ausência de OTA ( $p > 0,05$ ).

A geração de EROs no metabolismo do nematoide foi menor nos grupos onde a OTA foi adicionada ao vinho ( $p \leq 0,05$ ) quando comparado ao vinho livre de OTA. No entanto, os

níveis de LPO foram maiores em presença de OTA ( $p \leq 0,05$ ) quando comparado ao vinho livre de OTA. No entanto, a menor concentração de OTA avaliada ( $1 \mu\text{g L}^{-1}$ ) foi a que induziu maiores níveis de LPO, sendo este resultado fortemente correlacionado de forma inversa ( $r = -0,89$ ) aos menores níveis de flavonols, ácidos fenólicos e antocianinas presentes neste vinho. O mecanismo principal associado a LPO induzida pela OTA é baseado em sua capacidade de quelar  $\text{Fe}^{3+}$  e formar um complexo que é imediatamente reduzido a  $\text{OTA-Fe}^{2+}$ , que em presença de oxigênio inicia a reação de LPO (ALBERTO et al., 2005). Curiosamente, o vinho tinto com adição de OTA  $1$  e  $2 \mu\text{g L}^{-1}$  reduziu a geração de EROs, enquanto que  $4 \mu\text{g L}^{-1}$  aumentou essa geração.

Essa redução na geração de EROs e aumento da LPO no vinho adicionado de OTA está associado ao aumento na expressão das enzimas antioxidantes SOD e CAT no metabolismo de *C. elegans* mesmo nas menores concentrações de OTA avaliadas, está associado ao efeito hormético. Na toxicologia, o efeito hormético é definido como um processo no qual a exposição a uma dose baixa de um agente químico que é prejudicial em doses mais altas induz um efeito benéfico adaptativo na célula ou organismo (MARK, 2009). Assim este efeito pode estar relacionado a uma resposta adaptativa ao estresse induzido pela OTA no metabolismo do nematoide.

A adição de OTA ao vinho induziu aumento na expressão de SOD ( $p \leq 0,05$ ) em todas as concentrações quando comparado ao vinho tinto livre de OTA. A redução do conteúdo de antocianinas e ácidos fenólicos após adição de OTA ( $2$  e  $4 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente) pode estar associada à superexpressão de SOD ( $r = 1$ ). Menores níveis desses compostos podem atuar como ativadores do metabolismo de defesa contra o estresse oxidativo, conforme descrito por Gay et al. (2018) em células SH-SY5Y expostas a ácido vanílico e ferrulico ( $1 - 5 \mu\text{M}$ ) por 3 h e em seguida ao  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $400 \mu\text{M}$ ) por mais 24 h. Os resultados demonstraram a atuação destes ácidos fenólicos como ativadores das defesas antioxidantes neste tipo de célula.

A SOD apresentou-se como um bom marcador para avaliar a interação da OTA com os compostos fenólicos do vinho tinto no *C. elegans*, sendo que sua expressão foi afetada em todas as concentrações de OTA avaliadas. Além disso o aumento da expressão de SOD pode estar associado a manutenção da sobrevivência do nematoide, conforme já descrito (BACK et al., 2012). Assim, a ausência de efeitos da OTA na taxa de sobrevivência dos nematoides pode estar ligado a expressão da SOD aumentada, uma vez que foi observada uma correlação positiva forte ( $r = 1$ ) entre taxa de sobrevivência na presença de OTA ( $2 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e o aumento na expressão de SOD.

O aumento na expressão de CAT induzido pela adição de  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  de OTA ao vinho ( $p \leq 0,05$ ) apresentou correlação negativa forte ( $r = 0,89$ ) com os menores níveis de flavonols. Tratamento agudo (30 min) do *C. elegans* com quercetina ( $50 \mu\text{M}$ ) resultou em redução na expressão da enzima antioxidante CAT. Os autores propuseram que a redução da expressão de CAT pode ser o resultado dos efeitos antioxidantes diretos do flavonóide, uma vez que foi observado que a quercetina reduz os níveis de EROs sob diversas condições de estresse (DEUSING et al. 2015). Neste estudo os menores níveis de flavonols estão associados ao aumento da expressão de CAT. A expressão de CAT foi alterada apenas na menor concentração ( $1 \mu\text{g L}^{-1}$ ), o que pode estar moderadamente associado ( $r = 0,80$ ) com o aumento dos níveis de LPO observados em todas as concentrações de OTA avaliadas.

A utilização das cepas transgênicas de *C. elegans* para avaliar a expressão das enzimas antioxidantes endógenas SOD e CAT apresenta-se como uma vantagem na utilização deste modelo vivo, uma vez que o aumento da expressão das enzimas é acompanhado de aumento da fluorescência verde. Essa fluorescência é resultado da adição de uma proteína verde (GFP, do inglês: *green fluorescent protein*) fluorescente no gene destas cepas (CORSI et al., 2015). Epigallocatequina ( $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e quercetina ( $50 \mu\text{M}$ ) aumentaram e diminuíram a expressão de SOD, respectivamente, no metabolismo do *C. elegans*. A variação na expressão dessa enzima foi avaliada pelo aumento ou decréscimo na fluorescência verde emitida pelo nematoide transgênico (GFP). Essa variação nos resultados em presença dos dois compostos fenólicos foi associada a suas diferenças estruturais (DEUSING et al., 2015).

O presente estudo demonstra a importância de se avaliar a interação entre compostos benéficos e contaminantes presentes na dieta humana, visto que a presença de OTA no vinho tinto por 24 horas causou depleção de compostos fenólicos e redução da atividade antioxidante *in vitro*. O modelo *in vivo* baseado no metabolismo de *C. elegans* possibilitou avaliar marcadores de dano oxidativo associados aos efeitos tóxicos desta micotoxina. Contudo, ainda não há estudos avaliando a formação de complexos entre a OTA e os compostos fenólicos do vinho tinto, sendo estes estudos objeto de máxima prioridade para estudos futuros.

## 7. CONCLUSÕES

O conteúdo de antocianinas, flavonóis e ácidos fenólicos foi menor após a adição de OTA ao vinho tinto, resultando em perda do potencial antioxidante do vinho contra o  $H_2O_2$  e o radical  $\cdot OH$ .

No metabolismo do *C. elegans*, a presença de OTA no vinho induziu efeito hormético na geração de EROs, além de induzir aumento da expressão de SOD em todas as concentrações de OTA avaliadas e de CAT na menor concentração desta micotoxina. Todas as concentrações de OTA avaliadas induziram aumento dos níveis de LPO.

Assim, a avaliação da formação de complexos entre a OTA e os compostos fenólicos do vinho tinto serão de extrema importância para corroborar os efeitos da presença dessa micotoxina em vinhos tintos observados no presente estudo.

## 8. REFERÊNCIAS

ABDEL-WAHHAB, M.A. et al. Chitosan nanoparticles plus quercetin suppress the oxidative stress, modulate DNA fragmentation and gene expression in the kidney of rats fed ochratoxin A- contaminated diet. *Food and Chemical Toxicology*, 99, 209–221, 2017.

ABD EL-HALEEM, M.R. et al. Alleviative effect of myricetin on ochratoxin A-induced oxidative stress in rat renal cortex: histological and biochemical study. *Histology and Histopathology*, 31, 441–451, 2016.

ACOSTA-ESTRADA, B.A. et al. Bound phenolics in foods, a review. *Food Chemistry*, 152, 46-55, 2014.

ALBERTO, A. E. et al. Effect of Ethanol and Red Wine on Ochratoxin A-Induced Experimental Acute Nephrotoxicity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 6924-6929, 2005.

ALVES et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. *Química Nova*, 33, 2202-2210, 2010.

AMÉZQUETA, S. et al. OTA-producing fungi in foodstuffs: A review. *Food Control*, 26, 259-268, 2012.

AMIRA, A. G. et al. Astaxanthin and Docosahexaenoic Acid Reverse the Toxicity of the Maxi-K (BK) Channel Antagonist Mycotoxin Penitrem A. *Marine Drugs*, 14, 208, 2016.

ARNAO, M. B. Some methodological problems in determination of antioxidante activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends in Food & Technology*, 11, 419-421, 2000.

BACK, P. et al. ROS in Aging *Caenorhabditis elegans*: Damage or Signaling? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 14 p., 2012.

BAI, B. et al. Comparative study of phenolic compounds in Cabernet Sauvignon wines made in traditional and Ganimede fermenters. *Food Chemistry*, 141, 3984-3992, 2013.

BALDI, A. et al. Evaluation of the protective effects of  $\alpha$ -tocopherol and retinol against ochratoxin A cytotoxicity. *British Journal of Nutrition*, 91, 507-512, 2004.

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

BEN, S. I. et al. Quercetin protects HCT116 cells from Dichlorvos-induced oxidative stress and apoptosis. *Cell Stress Chaperones*, 21, 179-186, 2016.

BERTELLI, A. A.; DAS, D. K.; Grapes, wines, resveratrol and heart health. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 54, 468-476, 2009.

BOBAN, M. et al. Drinking pattern of wine and effects on human health: why should we drink moderately and with meals? *Food & Function*, 7, 2937-2942, 2016.

BOUAZIZ, C. et al. H. Different apoptotic pathways induced by zearalenone, T-2 toxin and ochratoxin A in human hepatoma cells. *Toxicology*, 254, 19-28, 2008.

BRASIL - Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Resolução RDC N° 59, de 26 de fevereiro de 2013. Limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. *Diário Oficial da União*, Seção 1, n. 252, ISSN 1677-7042, 2013.

BRASIL - Ministério Da Agricultura. Pecuária E Abastecimento. Lei n° 7.678, de 08 de novembro de 1988 regulamentada pelo Decreto n° 8.198, de 20 de fevereiro de 2014. *Diário Oficial da União*. Aprova as Normas referentes a Complementação dos Padrões de Identidade e Qualidade do Vinho, 2014.

BRENNER, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 77, 71-94, 1974.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; MAIORINO, M. Glutathione peroxidases, *Biochemistry and Biophysica Acta*, 1830, 3289-3303, 2013.

BROWN, M. K.; EVANS, J. L.; LUO, Y. Beneficial effects of natural antioxidants EGCG and  $\alpha$ -lipoic acid on life span and age-dependent behavioral declines in *Caenorhabditis elegans*. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 85, 620-628, 2006.

CÁCERES-MELLA, A. et al. Composição fenólica e características bucais resultantes da mistura de vinhos tintos chilenos. *Jornal da Ciência da Alimentação e Agricultura*, 94, 4, 666-676, 2013.

CANO-SANCHO, G. et al. Cytotoxicity of the mycotoxins deoxynivalenol and ochratoxin A on Caco-2 cell line in presence of resveratrol. *Toxicology in Vitro*, 29, 1639-1646, 2015.

CAZARIN, K. C. C.; CORREA, C. L.; ZAMBRONE, F. A. D.; Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 40, 289-299, 2004.

COLLINS, J. J.; EVASON, K.; KORNFIELD, K.; Pharmacology of delayed aging and extended lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Experimental Gerontology*, 41, 1032-1039, 2006.

CORCUERA, L. A. et al. A polyphenol-enriched cocoa extract reduces free radicals produced by mycotoxins. *Food Chemistry Toxicology*, 50, 989-995, 2012.

CORSI, A.K.; WIGHTMAN, B.; CHALFIE, M.; A transparent window into biology: a primer on *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 200, 387-407, 2015.

COSTA DE CAMARGO, A. et al. Low molecular weight phenolics of grape juice and winemaking byproducts: antioxidant activities and inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein cholesterol and DNA strand breakage. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 62, 12159-12171, 2014.

COSTA, P. C. et al. Chronic purple grape juice consumption induces age-dependent changes on cognitive function in elderly women. *Journal of Systems and Integrative Neuroscience*, 3, 2-6, 2017.

COSTA, S. et al. Catechins: Natural free-radical scavengers against ochratoxin A-induced cell damage in a pig kidney cell line (LLC-PK1). *Food Chemistry Toxicology*, 45, 1910-1917, 2007.

DE BONO, M. Molecular approaches to aggregation behavior and social attachment. *Journal of Neurobiology*, 54, 78-92, 2003.

DEUSING, D. J. et al. A catechin-enriched green tea extract prevents glucose-induced survival reduction in *Caenorhabditis elegans* through sir-2.1 and uba-1 dependent hormesis. *Fitoterapia*, 102, 163-170, 2015.

DOI, K.; UETSUKA, K.; Mechanisms of Mycotoxin-Induced Neurotoxicity through Oxidative Stress-Associated Pathways. *International Journal of Molecular Science*, 12, 5213-5237, 2011.

EC - European Commission. Commission Regulation. n° 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in food stuffs. *OJ L 70*, p. 12, 2006.

EL ADLOUNI, C. et al. Phenobarbital increases DNA adduct and metabolites formed by ochratoxin A: role of CYP 2C9 and microsomal glutathione-S-transferase. *Environmental and Molecular Mutagenese*, 35, 123-131, 2000.

ENCISO, J. M. Is oxidative stress involved in the sex-dependent response to ochratoxin A renal toxicity? *Food and Chemical Toxicology*, 116, 379-387, 2018.

FENG, W. H. et al. Aflatoxin B1-Induced Developmental and DNA Damage in *Caenorhabditis elegans*. *Toxins*, 9, 9, 2017.

FISCHER, N. et al. The resveratrol derivatives trans-3,5-dimethoxy-4-fluoro-4'-hydroxystilbene and trans-2,4,6-trihydroxystilbene decrease oxidative stress and prolong lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 69, 73-81, 2017.

FREIRE, L. et al. Influence of physical and chemical characteristics of wine grapes on the incidence of *Penicillium* and *Aspergillus* fungi in grapes and ochratoxin A in wines. *International Journal of Food Microbiology*, 241, 181-190, 2017.

GAGLIANO, N. et al. A-Induced Renal Cortex Fibrosis and Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Molecular Mechanisms of Ochratoxin A-Injury and Potential Effects of Red Wine. *Molecular Medicine*, 11, 2005.

GAY, N. H. et al. Neuroprotective Effects of Phenolic and Carboxylic Acids on Oxidative Stress-Induced Toxicity in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells. *Neurochemical Research*, 43, 619-636, 2018.

GENTILE, F. et al. Organic wine safety: UPLC-FLD determination of Ochratoxin A in southern Italy wines from organic farming and vinification. *Food Control*, 59, 20-26, 2016.

GIEHL, M. R. et al. Eficácia dos flavonoides da uva, vinho tinto e suco de uva tinto na prevenção e tratamento de aterosclerose. *Scientia Medica*, 17, 145-155, 2007.

GRIMES, K. L. et al. Enhancing the Cancer Cell Growth Inhibitory Effects of Table Grape Anthocyanins. *Journal of Food Science*, 1278, 2018.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M.; ARUOMA, O. I. The deoxyribose method: a simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Analytical Biochemistry*, 165, 215-9, 1987.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; *Free radicals in biology and medicine*. 4 ed., Oxford: Oxford University Press, 852, 2007.

HARRINGTON, L. A.; HARLEY, C. B.; Effect of vitamin E on lifespan and reproduction in *Caenorhabditis elegans*. *Mechanisms of Ageing and Development*, 43, 71-78, 1988.

HOLLECKER, L. et al. Simultaneous determination of polyphenolic compounds in red and white grapes grown in Sardinia by high performance liquid chromatography-electron spray

ionization-mass spectrometry. *Journal of Chromatography Analytical*, 1215, 3402-3408, 2009.

HSU, C. P. et al. Inhibitory effect and mechanisms of an anthocyanins- and anthocyanidins-rich extract from purple-shoot tea on colorectal carcinoma cell proliferation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 3686-3692, 2012.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 5, 1841-1856, 2005.

IARC – International Agency for Research on Cancer. *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. Disponível em:  
<http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>. Acesso em: 25 de julho de 2017.

IBRAVIN – Instituto Brasileiro do vinho. *Mercado de Vinhos*. Disponível em:  
[www.ibravin.org.br](http://www.ibravin.org.br), acesso em 22 de Janeiro de 2019.

JANNIN, B. Transport of resveratrol, a cancer chemo preventive agent, to cellular targets: plasmatic protein binding and cell up take. *Biochemical Pharmacology*, 68, 1113- 1118, 2004.

KEN D.; OAKES, G. J.; KRAAK, V. D. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to puLPO mill effluent. *Aquatic Toxicology*, 63, 447-463, 2003.

KHOURY, A.; ATOUI, A.; Ochratoxin A: General Overview and Actual Molecular Status. *Toxins*, 2, 461-493, 2010.

KILIÇ, I.; YESILOGLU, Y. Spectroscopic studies on the antioxidant activity of *p*-coumaric acid. *Spectrochim. Acta Part A Molecular and Biomolecular Spectroscience*, 115, 719-724, 2013.

KIM, H. S.; QUON, M. J.; KIM, J.A. New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate. *Redox Biology*, 2, 187-95, 2014.

KOSZEGI, T.; POÓR, M. Ochratoxin A: Molecular Interactions, Mechanisms of Toxicity and Prevention at the Molecular Level. *Toxins*, 8, 111-136, 2016.

KURIN, E.; MUCAJI, P.; NAGY, M. *In Vitro* Antioxidant Activities of Three Red Wine Polyphenols and Their Mixtures: An Interaction Study. *Molecules*, 17, 14336-14348, 2012.

KUSKOSKI, E. M. et al. Aplicación de diversos método químicos para determinar actividad antioxidante em puLPOa de frutos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25, 726-732, 2005.

LINGUA, M. S. et al. Da uva ao vinho: mudanças na composição fenólica e sua influência na atividade antioxidante. *Food Chemistry*, 208, 228-238, 2016.

LIU, W. et al. Selective anti-proliferation of HER2-positive breast cancer cells by anthocyanins identified by high-throughput screening. *PLoS One*, 8, 581-586, 2013.

LIU, Y. et al. The Influence of Prefermentative Addition of Gallic Acid on the Phenolic Composition and Chromatic Characteristics of Cabernet Sauvignon Wines. *Journal of Food Science*, 81, 1669-1678, 2016.

LOIZZO, M. R. et al. Detection of ochratoxin A and *cis*- and *trans*-resveratrol in red wines and their musts from Calabria (Italy). *Food Additives & Contaminants: Part A*, 11, 1561-1568, 2011.

LÓPEZ, N. et al. Effect of a pulsed electric field treatment on the anthocyanins composition and other quality parameters of *Cabernet Sauvignon* freshly fermented model wines obtained after different maceration times. *LWT - Food Science and Technology*, 42, 1225-1231, 2009.

LU, H. et al. Aflatoxin B1 can be complexed with oxidised tea polyphenols and the absorption of the complexed aflatoxin B1 is inhibited in rats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97, 1910-1915, 2016.

MARIN-KUAN, M. et al. Ochratoxin A carcinogenicity involves a complex network of epigenetic mechanisms. *Toxicon*, 52, 195-202, 2008.

MARK, P. M. Hormese definida. *Ageing Research Reviews*, 7, 1-7, 2008.

MCLAUGHLIN, J. et al. Ochratoxin A increases permeability through tight junctions by removal of specific claudin isoforms. *American Journal of Physiology and Cell Physiology*, 287, 1412-1417, 2004.

MEDINA, A. et al. Study of spanish grape mycobiota and ochratoxin A production by isolates of *Aspergillus tubingensis* and other members of *Aspergillus* section Nigri. *Applied Environmental Microbiology*, 71, 4696-4702, 2005.

MIKULÍKOVÁ, R. et al. Study of ochratoxin A content in South Moravian and foreign wines by the UPLC method with fluorescence detection. *Food Chemistry*, 133, 55-59, 2012.

MIRANDA-VIZUETEA, A.; VEAL, E. A. *Caenorhabditis elegans* as a model for understanding ROS function in physiology and disease. *Redox Biology*, 11, 708-714, 2017.

MITJANS, M. et al. Immunomodulatory activity of a new family of antioxidants obtained from grape polyphenols. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52, 7297-7299, 2004.

MUÑOZ-ESPADA, A. C. et al. Anthocyanin quantification and radical scavenging capacity of Concord, Norton, and Marechal Foch Grapes and wines. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52, 6779-6786, 2004.

NOGUEIRA, S.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Prevalência de ocratoxina A em alimentos e consequentes problemas de segurança alimentar. *Alimentação Humana*, 12, 69-75, 2006.

OTEIZA, J. M. et al. Influence of production on the presence of patulin and ochratoxin A in fruit juices and wines of Argentina. *Food Science and Technology*, 80, 200-207, 2017.

PARADELLS, S. et al. Neurotoxic effects of ochratoxin A on the subventricular zone of adult mouse brain. *Journal Applied Toxicology*, 35, 737-751, 2015.

- PETRIK, J. et al. Apoptosis and oxidative stress induced by ochratoxin A in rat kidney. *Arch. Toxicology*, 77, 685-693, 2003.
- PRATIKSHA, V. B. et al. Cytotoxic effects of Ochratoxin A in Neuro-2a Cells: Role of oxidative stress evidenced by N-acetylcysteine. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1-12, 2016.
- PUN, P. B. L. et al. Ageing in nematodes: do antioxidants extend lifespan in *Caenorhabditis elegans*? *Biogerontology*, 11, 17-30, 2010.
- QUINTELA, S. et al. Occurrence of ochratoxin A in Rioja Alavesa wines. *Food Chemistry*, 126, 302-305, 2011.
- RANALDI, G. et al. Effects of red wine on ochratoxin A toxicity in intestinal Caco-2/TC7 cells. *Toxicology in Vitro*, 21, 204-210, 2007.
- RANKIN, C. H. From gene to identified neuron to behaviour in *Caenorhabditis elegans*. *Nature Reviews Genetics*, 3, 622-630, 2002.
- RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237, 1999.
- REMIRO, R. et al. Quantification of ochratoxin A and five analogues in red wines from Navarra. *Food Control*, 27, 139-145, 2012.
- RIBÉREAU-GAYON, P. et al. *Handbook of Enology: The Microbiology of Wine and Vinifications*. 2. ed. England: John Wiley & Sons Ltd, 2006.
- RINGOT, D. et al. In vitro biosorption of ochratoxin A on the yeast industry by-products: Comparison of isotherm models. *Bioresource Technology*, 98, 1812-1821, 2006.
- ROGINSKI, V.; LISSI, E. A.; Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, 92, 235-254, 2005

SARIGIANNIS, Y. et al. Ochratoxin A levels in Greek retail wines. *Food Control*, 42, 139-143, 2014.

SARUBBO, F. et al. Effects of Resveratrol and Other Polyphenols on Sirt1: Relevance to Brain Function During Aging. *Current Neuropharmacology*, 15, 1570 -1579, 2017.

SAVA, V. et al. Acute neurotoxic effects of the fungal metabolite Ochratoxin A. *Neurotoxicology*, 27, 82-92, 2006a.

SAVA, V. et al. Can low level exposure to ochratoxin A cause parkinsonism? *Journal of Neurological Science*, 249, 68-75, 2006b.

SCHAAF, G. J. et al. The role of oxidative stress in the ochratoxin A-mediated toxicity in proximal tubular cells. *BBA Molecular Basis Discussion*, 20, 149-158, 2002.

SOUSA, C. M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, 30, 351-355, 2006.

SPAYD, S. E. et al. Separation of sunlight and temperature effects on the composition of *Vitis Vinifera* cv. Merlot Berries. *American journal of Enology and Viniculture*, 5393, 170-182, 2002.

SULSTON, J. Cell lineage. In *The nematode C. elegans* (ed. W.B. Wood). Chapter 5. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 123-155, 1988.

SULSTON, J. E. et al. The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology*, 100, 64-119, 1983.

SUN, A.Y. et al. The “French paradox” and beyond: Neuro-protective effects of polyphenols. *Free Radicals Biology Medicine*, 324, 314-318, 2002.

TAI, A.; SAWANO, T.; ITO, H. Antioxidative Properties of Vanillic Acid Esters in Multiple Antioxidant Assays. *Bioscience and Biotechnology Biochemistry*, 76, 314-318, 2012.

TAMBARA, L. A. et al. Purple cherry (*Eugenia uniflora L.*) protects against oxidative stress and increases the longevity of *Caenorhabditis elegans* via the DAF-16 / FOXO route. *Food and Chemical Toxicology*, 120, 639-650, 2018.

TAO, Y. et al. Ochratoxin A: Toxicity, oxidative stress and metabolism. *Food and Chemical Toxicology*, 112, 320-331, 2018.

USDA - United States Departamento of Agriculture. *Food and Nutrition*. Disponível em: <https://www.usda.gov/topics/food-and-nutrition>. Acesso em: 29 de julho de 2017.

UVIBRA – União Brasileira de Vitivinicultura. Disponível em: [http://www.uvibra.com.br/dados\\_estatisticos.htm](http://www.uvibra.com.br/dados_estatisticos.htm). Acesso em: 20 de julho de 2017.

VAN DER MERWE, K. J. et al. Ochratoxin A a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature*, 205, 1112-1132, 1965.

VAR, I.; KABAK, B. Ocorrência de ocratoxina A em vinhos turcos. *Microchemical Journal*, 86, 241-247, 2007.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano Oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Química Nova*, 30, 1323-1338, 2007.

VEGA, M. et al. Ochratoxin A occurrence in wines produced in Chile. *Food Control*, 28, 147-150, 2012.

VITALI C. D. et al. Differences in the levels of pesticides, metals, suLPOhites and ochratoxin A between organically and conventionally produced wines. *Food Chemistry*, 246, 394-403, 2018.

WANG, H. L. et al. Absorbtion of quercetin and rutin across human intestinal epithelial by using Caco 2 cells. *Chinese Journal of Jilin University Medical*, 1, 33-39, 2007.

WELKE, J. E. et al. Determination of ochratoxin A in wine by high-performance thin-layer chromatography using charged coupled device. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 21, 3, 441-446, 2010.

WINK, M. Evolutionary advantage and molecular modes of action of multicomponent mixtures used in phytomedicine. *Current Drug Metabolism*, 9, 996-1009, 2008.

WIN – Wine in Moderation. *Wine & Moderation*. Disponível em: <https://www.wineinmoderation.eu/en/content/Wine-Health.11>. Acesso em: 29 de julho de 2017.

WORMATLAS. Disponível em: <http://www.wormatlas.org/>. Acesso em: 10 de fevereiro de 2019.

WU, Y. et al. Influence of freeze concentration technique on aromatic and phenolic compounds color attributes, and sensory properties of Cabernet Sauvignon wine. *Molecules*, 22, 899-917, 2017.

XI, Z. M. et al. Exogenously applied abscisic acid to Yan73 (*V. vinifera*) grapes enhances phenolic content and antioxidant capacity of its wine. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 64, 444-451, 2012.

XU, F. et al. Phenolic profiles and antioxidant properties of Young wines made from Yan 73 (*Vitis Vinifera L.*) and Cabernet Sauvignon (*Vitis Vinifera L.*) grapes treated by 24-epibrassinolide. *Molecules*, 19, 10189-10207, 2014.

YANG, Z. et al. Multi-Toxic Endpoints of the Foodborne Mycotoxins in Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Toxins*, 7, 5224-5235, 2015.

YOON, S. et al. Proteome response to ochratoxin A-induced apoptotic cell death in mouse hippocampal HT22 cells. *Neuro Toxicology*, 30, 666-676, 2009.

ZHANG, X. et al. Ochratoxin A induces apoptosis in neuronal cells. *Genes Nutrition*, 4, 41-48, 2009.

ZHAO, J.; RIEDIKER, M.; Detecting The Oxidative Reactivity Of Nanoparticles: A New Protocol For Reducing Artifacts. *Journal of Nanoparticle Research*, 16, 2493-2506, 2014.

ZOCHE, R. G. S. et al. Wines produced with 'Cabernet Sauvignon' grapes from the region of Bagé in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Pesquisa agropecuária brasileira*, 52, 311-318, 2017.