

CENTRO ESTADUAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA PAULA SOUZA  
UNIDADE DE PÓS-GRADUAÇÃO, EXTENSÃO E PESQUISA  
MESTRADO PROFISSIONAL EM GESTÃO E TECNOLOGIA  
EM SISTEMAS PRODUTIVOS

SILVIA CÂNDIDA CORRÊA FERNANDES BOTTI

Extração e caracterização do resveratrol do bagaço da uva, análise comparativa entre métodos de secagem e comprovação da atividade biológica *in vitro*.

São Paulo  
Março/2016

SILVIA CÂNDIDA CORRÊA FERNANDES BOTTI

Extração e caracterização do resveratrol do bagaço da uva, análise comparativa entre métodos de secagem e comprovação da atividade biológica *in vitro*.

Dissertação apresentada como exigência para a obtenção do título de Mestre em Gestão e Tecnologia em Sistemas Produtivos do Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza, no Programa de Mestrado Profissional em Gestão e Tecnologia em Sistemas Produtivos, sob a orientação do Profa. Dra. Silvia Pierre Irazusta

São Paulo

Março/2016

SILVIA CÂNDIDA CORRÊA FERNANDES BOTTI

Extração e caracterização do resveratrol do bagaço da uva, análise comparativa  
entre métodos de secagem e comprovação da atividade biológica *in vitro*.

---

Profª. Dra. Silvia Pierre Irazusta

---

Prof. Dr. Antônio Odair Santos

---

Prof. Dr. Eduardo Acedo Barbosa

São Paulo, 30 de março de 2016

A minha família, dedico este trabalho, com  
todo o meu amor em especial ao meu esposo  
Nilson Botti.

## AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Dra. Sílvia Pierre Irazusta pela confiança, paciência, carinho e cumplicidade.

Ao professor Dr. Francisco Tadeu Degasperi pela colaboração e dedicação.

A todos os professores do mestrado que ao longo desses dois anos aprendi muito, em especial à professora Dra. Elizabeth Pelosi Teixeira.

Aos professores da Escola Técnica Conselheiro Antonio Prado-Campinas, Prof. Dr. Paulo Costa e Prof. Marcos Cesário, que me ensinaram a trabalhar com o cromatógrafo e Profa. Dra. Rosângela Rodrigues Leme Pellegrino, pela receptividade.

À Lilian Maria Ricardo Duarte e o Fábio Brito de Azevedo do SENAI Barra Funda pela oportunidade de realizar as análises de cromatografia. E ao Diretor Eduardo José Alvarez que confiou em mim desde o começo, me levando para curso de vinho no Rio Grande do Sul.

Ao Sr. Antônio Pizzolante que cedeu o bagaço da uva, ao Inaldo Dias, técnico do Laboratório da Etec Benedito Storani pela preciosa ajuda nas análises.

Aos Drs. Luiz Carlos Gomes e Lenir Ribeiro Yago, do *Ao Pharmaceutico*, pela doação do padrão do resveratrol.

Aos companheiros do mestrado. Enfim, a todos que se acham no direito de estar aqui e que de alguma forma, contribuíram para que eu me tornasse uma pessoa melhor profissionalmente e emocionalmente.

Às minhas amigas, Rose Cândido, Valdirene O. Platen, Ana Cláudia Macedo, Tânia Almeida, Matilde Benetatti e ao amigo e Professor Daniel Büll, sempre torcendo por mim.

Agradeço a Deus pelo dom da vida e ao meu anjo da guarda, sempre ao meu lado me amparando.

A sabedoria da natureza é tal que não produz  
nada de supérfluo ou inútil  
(Nicolau Copérnico)

## RESUMO

**BOTTI, S.C.C.F. Extração e caracterização do resveratrol do bagaço da uva, análise comparativa entre métodos de secagem e comprovação da atividade biológica *in vitro*.**

71 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Gestão e Tecnologia em Sistemas Produtivos). Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza, São Paulo, 2016.

O principal resíduo do processo de vinificação é o bagaço da uva, o qual comumente é utilizado para fabricação da grapa ou para compostagem. Por ser rico em substâncias bioativas como o resveratrol, de conhecido valor terapêutico e cosmético, bem como antioxidante natural, o presente trabalho propôs avaliar comparativamente métodos de preservação e extração do resveratrol e confirmar, por meio de ensaio *in vitro*, a sua propriedade anti-câncer, como subsídios para a utilização sustentável do resíduo da vinicultura, bem como para a aplicação biológica do princípio ativo. Neste trabalho foi realizada uma análise comparativa dos processos de secagem do bagaço, procedendo-se a desidratação e a liofilização e, previamente à obtenção do resveratrol. A caracterização analítica do extrato, por Fourier Transform Infrared (FTIR) e High Performance/Pressure Liquid Chromatography (HPLC), permitiram sua identificação qualitativa e quantitativa, indicando a liofilização do bagaço como a melhor forma de preservar o resveratrol na amostra. A fim de se confirmar a atividade biológica do resveratrol, procedeu-se a realização do ensaio de reversão da mutagenicidade do herbicida trifluralina, com o modelo de *Allium cepa*, o qual comprovou a atividade anti-mutagênica do resveratrol, que foi proporcional à sua concentração até 1ppm, após a qual não houve efeito adicional.

**Palavras-chave:** bagaço de uva, resveratrol, secagem, *Allium cepa*, antimutagênese.

## ABSTRACT

**BOTTI, S.C.C.F. Extraction and characterization of resveratrol from grape pomace, comparative analysis of drying methods and evidence of biological activity *in vitro*.** 71f. Dissertation (Professional Master in Management and Technology in Production Systems). Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza, São Paulo, 2016.

The main residue of winemaking process is the grape pomace, which is commonly used for manufacturing graspa or for composting. For its high level content in bioactive substances such as resveratrol, therapeutic and cosmetic value well known, as well as natural antioxidant, this paper proposed evaluate preservation methods and extraction of resveratrol and confirm by vitro test medium, your anti- cancer property, as base for the sustainable use of residue from viniculture as well as for the biological application of the active principle. In this paper a comparative analysis of grape pomace drying process was performed, proceeding to dehydration and lyophilization and then obtaining resveratrol. Analytical characterization of the extract by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and High Performance / Liquide Pressure Chromatography (HPLC) allowed a qualitative and quantitative identification, indicating lyophilization of the residue as the best way to preserve resveratrol in the sample. In order to confirm the biological activity of resveratrol, was performed the perform the test reversal of mutagenicity of the herbicide trifluralin, with the *Allium Cepa* model, which demonstrated the anti-mutagenic activity of resveratrol, which was proportional to its concentration up to 1ppm, after which there was no additional effect.

**Keywords:** grape pomace, resveratrol, drying, *Allium Cepa*, antimutagenesis.



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Produção de vinhos .....	16
Tabela 2:	Comparação de rendimento de secagem e umidade entre os métodos de conservação do Bagaço .....	47
Tabela 3:	Comparação das extrações do composto .....	49
Tabela 4:	Concentração de Resveratrol em $\mu\text{g/g}$ .....	51
Tabela 5:	Parâmetros qualitativos dos extratos .....	52
Tabela 6:	Dados consolidados dos parâmetros quantitativos dos extratos .....	53
Tabela 7:	Índice de germinação: efeito positivo do resveratrol sobre a inibição da germinação pela trifluralina .....	56

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Distribuição majoritária dos principais compostos fenólicos na uva .....	18
Figura 2:	Estrutura química das antocianinas .....	19
Figura 3:	Estrutura química da antoxantina.....	20
Figura 4:	Estrutura química do ácido benzoico .....	20
Figura 5:	Estrutura química do ácido tartárico .....	21
Figura 6:	Estrutura química do tanino hidrolisável e tanino condensado .....	22
Figura 7:	Estrutura química do trans-resveratrol .....	23
Figura 8:	Diagrama das fases da água .....	34
Figura 9:	Sistema de vácuo para liofilização de alimentos .....	38
Figura 10:	Liofilizador .....	40
Figura 11:	Secagem pelos dois métodos empregados.....	41
Figura 12:	Comparação entre os métodos de secagem a) rendimento secagem e b) umidade .....	48
Figura 13:	Comparação entre média dos rendimentos das extrações do extrato bruto.....	49
Figura 14:	Cromatograma das amostras de extrato e padrão.....	51
Figura 15:	Comparação da concentração de resveratrol nos métodos de secagem .....	52
Figura 16:	Espectroscopia .....	54
Figura 17:	Índice de Germinação.....	56
Figura 18:	Atividade anti-genotóxica do resveratrol sobre a trifluralina .....	57
Figura 19:	Atividade antimutagênica do resveratrol.....	57

## LISTA DE SIGLAS

CCE	Comissão das Comunidades Europeias
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EMPRAPA	Empresa Brasileira de Serviço Agropecuário
ETEC	Escola Técnica
FATEC	Faculdade de Tecnologia de Sorocaba
FEEC	Faculdade de Engenharia Elétrica
FIEMG	Federação das Indústrias do Estado de Minas Gerais
FTIR	Fourier Transform Infrared
HPLC	High Performance/Pressure Liquide Chromatography
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IG	Índice de germinação
IQ	Instituto De Quimica
MN	Micronúcleo
MPEs	Micro e Pequenas Empresas
NISP	<i>National Industrial Symbiosis Programme</i>
OIV	<i>Organisation Internationale de la vigne et du Vin</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCS	Programa Internacional de Segurança Química
PMSI	Programas de Simbiose Industrial
RL	Radicais livres
RNA	Ácido ribonucléico
SENAI	Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial
UNEP	Programa Ambiental das Nações Unidas
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
UPAs	Unidades Produtoras Agrícolas
UVIBRA	União Brasileira de Vitivinicultura
IPCS	Programa Internacional de Segurança Química
OMS	Organzação Mundial da Saúde
UNEP	Programa Ambiental das Nações Unidas

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>12</b>
1.1 Objetivo	14
1.2 Objetivos específicos	14
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	<b>15</b>
2.1 Produção da viticultura	15
2.2 Composição da uva	17
2.2.1 Antocianinas	18
2.2.2 Antoxantinas	19
2.2.3 Taninos	21
2.2.4 Resveratrol	22
2.3 Viticultura sustentável	23
2.4 Resíduos da Vinificação	25
2.5 Tecnologias de reaproveitamento do resíduo	26
2.5.1 Grasp	26
2.5.2 Compostagem	28
2.6 Alimentos funcionais	28
2.7 Propriedades biológicas do resveratrol	29
2.8 Radicais livres	30
2.9 Processo de Secagem	31
2.9.1 Desidratação	31
2.9.2 Liofilização	32
2.10 Mutagênese e antimutagênese	34
2.11 Bioensaios de genotoxicidade e mutagenicidade	35
<b>3 METODOLOGIA</b>	<b>37</b>
3.1 Obtenção do bagaço	37
3.2 Amostras	38
3.2.1 Insumos adicionados a 80 kilos de uva	39
3.3 Extração do resveratrol	41
3.3.1 Material Utilizado	41
3.3.2 Método de extração	41
3.4 Caracterização e quantificação do resveratrol	42
3.5 Bioensaio de <i>Allium cepa</i>	44
3.5.1 Material utilizado	44
3.6 Determinação do efeito antimutagênico	46
3.7 Análise Estatística	46
<b>4 RESULTADOS</b>	<b>46</b>
4.1 Secagem do bagaço	47
4.2 Análise por HPLC	50
4.3 Análise qualitativa por FTIR	53
4.4 Avaliação da atividade biológica do resveratrol: bioensaio de <i>Alium cepa</i>	55
<b>5 DISCUSSÃO</b>	<b>58</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b>	<b>60</b>
<b>7 REFERÊNCIAS</b>	<b>62</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O setor agrícola produz uma grande quantidade de subprodutos e resíduos representando um crescente interesse industrial, tanto por razões econômicas como por razões ambientais e de sustentabilidade. Isto também é verdadeiro quando estes resíduos são provenientes da vinificação (SPIGNO *et al*, 2008). As vinícolas estão entre as indústrias que mais sofrem com o acúmulo de resíduos orgânicos, bem como entre as que buscam por novas tecnologias para agregar valores aos resíduos, além de diminuir o impacto ambiental. Embora as vinícolas gerem resíduos biodegradáveis, os mesmos necessitam de um tempo mínimo de degradação, constituindo uma fonte de poluentes (HUBER *et al* 2012).

O bagaço da uva é o principal resíduo gerado no processo de vinificação e a sua utilização tem um importante impacto na redução de resíduos, permitindo agregar valor, já que neste material, que hoje é desperdiçado e subutilizado, encontram-se várias substâncias bioativas e ricas em polifenóis (SALES *et al*, 2012). A maior parte do bagaço da uva é destinada à compostagem e à ração animal e, pequena parte, é destinada à fabricação de bebidas destiladas e fermentadas (TORRES *et al*, 2002). O bagaço da uva contém polifenóis, reconhecidos pela capacidade antioxidante e por seus efeitos benéficos à saúde humana, mais especificamente na prevenção de diversas enfermidades como as cardiopatias, neuropatias, além do desenvolvimento de neoplasias (HARBONE, WILLIAMS 2000; LEE, *et al*, 2012).

Os antioxidantes são compostos químicos que têm a capacidade de reagir com os radicais livres restringindo seus efeitos deletérios ao organismo, retardando a velocidade de oxidação, através de um ou mais mecanismos, além da inibição de radicais livres como a complexação com metais (ROCKENBACH, 2008). Sabe-se que os radicais livres (RL) apresentam no átomo da última camada eletrônica, um número ímpar de elétrons conferindo alta reatividade a estas partículas CONTINGUIBA *et al*, 2013).

Os principais antioxidantes encontrados na uva são os compostos fenólicos, substâncias amplamente distribuídas na natureza, em particular nas frutas e vegetais. Os compostos fenólicos são formados pelas antocianinas, flavonoides e derivados de estilbeno, três classes de compostos que apresentam características peculiares e desempenham papéis

importantes nas plantas, como por exemplo, em resposta à uma situação de estresse contra o ataque de patógenos (VACCARI, *et al*, 2009; FLAMINI *et al*, 2013). Dentro da classe do estilbeno é de particular interesse o resveratrol que tem sido descrito como um composto antioxidante e anti-inflamatório, apresentando atividade anti-neoplásica e efeito protetor cardiovascular, além de promover aumento da longevidade, devido à sua capacidade de reduzir a agregação de plaquetas, modulando o metabolismo dos lipídeos e inibindo a oxidação de lipoproteína de baixa densidade (FRANKEL *et al*, 1993; WANG *et al*, 2002; SHIMA *et al*, 2013).

O resveratrol funciona como uma fitoalexina sintetizada nas plantas em resposta ao estresse biótico como ferimentos na uva decorrente de ação fúngica ou abiótico, como exposição à radiação ultravioleta (SAUTTER *et al*, 2005). Durante a última década o resveratrol demonstrou possuir um amplo espectro de propriedades farmacológicas, visto que ações bioquímicas e moleculares contribuem para os seus efeitos contra células pré-cancerosas. O resveratrol age nas três fases distintas da carcinogênese (iniciação, promoção e progressão), por modulação controla vias de transdução de sinais que controlam a divisão celular e crescimento, apoptose, angiogênese, inflamação e metástase, e por isso é considerado por alguns, como uma promissora terapia anticâncer (MORAES e LOCATELLI, 2010). A propriedade anticâncer do resveratrol é apoiada por estudos que demonstraram sua inibição sobre a proliferação de uma grande variedade de células tumorais humanas *in vitro* (SHUKLA e SHING 2011).

A grande procura da humanidade por produtos que favoreçam uma vida saudável tem impulsionado novas pesquisas com compostos naturais como é o caso dos polifenóis, destacando o resveratrol, que está presente em diversas plantas, especialmente nas uvas e que permanecem no bagaço após a fermentação e prensagem (SAUTTER, 2005).

Neste trabalho foram estudadas metodologias para avaliar comparativamente métodos de preservação do teor e qualidade, bem como a atividade biológica do composto fenólico resveratrol, a partir do resíduo da vinicultura, com proposta de aproveitamento deste resíduo. Espera-se ainda, contribuir com subsídios para serem extrapolados em testes *in vivo* e auxiliar no direcionamento da colheita, a partir de análises com quantidades de resveratrol já

padronizadas antes da colheita de uvas, e, como consequência, agregar-lhe valor econômico, pela otimização da extração e utilização do princípio ativo resveratrol, de conhecida propriedade farmacológica, além da minimização dos impactos ambientais deste resíduo.

## 1.1 Objetivo

O presente estudo se propôs a avaliar comparativamente métodos de preservação e extração do resveratrol e confirmar, por meio de ensaio *in vitro*, as suas propriedades anti-câncer, como subsídios para a utilização sustentável do resíduo da vinicultura, como também, para a aplicação biológica do princípio ativo.

## 1.2 Objetivos específicos

- Padronizar técnica de extração orgânica do resveratrol no laboratório da Escola Técnica (ETEC) Benedito Storani do Centro Paula Souza em Jundiaí;
- Identificar e quantificar o princípio ativo por High Performance/Pressure Liquide Chromatography (HPLC) e Fourier Transform Infrared (FTIR) com as colaborações dos laboratórios das Escola Técnica (ETEC) Conselheiro Antônio Prado do Centro Paula Souza em Campinas, Escola SENAI (Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial) “Horácio Augusto da Silveira” , a Faculdade de Engenharia Elétrica da Universidade Estadual ( FEEC-UNICAMP) e do Instituto de Química ( IQM – UNICAMP)
- Quantificar o rendimento do composto fenólico por massa de resíduo sólido, comparando-se dois processos de retirada de água, por calor (desidratação) e por sublimação (liofilização);
- Quantificar o princípio ativo no composto fenólico, comparando-se dois processos de retirada de água, por calor (desidratação) e por sublimação (liofilização);
- Avaliar a atividade anti-mutagênica do resveratrol em ensaio com *Allium cepa*, a fim de contribuir com os achados da literatura sobre a atividade biológica deste composto.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Produção da viticultura

Dados históricos revelam que a primeira introdução da videira no Brasil foi feita pelos colonizadores portugueses em 1532, por Martin Afonso de Souza, na então Capitania de São Vicente, hoje Estado de São Paulo. A partir deste ponto e, através de introduções posteriores, a viticultura expandiu-se para outras regiões do país, sempre com cultivares de *Vitis vinifera* procedentes de Portugal e da Espanha. O termo viticultura refere-se à ciência que estuda o cultivo da uva, que poderá ser utilizada para diversos fins como elaboração de vinhos, uva-passa e suco, já o termo vinicultura é a ciência que tem como objetivo a *produção* do vinho. Um terceiro termo seria a vitivinicultura que é junção dos dois termos anteriores abrangendo desde o cultivo da uva até a produção do vinho (CV, 2014). Nas primeiras décadas do século XIX, com a importação das uvas americanas procedentes da América do Norte, foram introduzidas as doenças fúngicas que levaram a viticultura colonial à decadência. A cultivar Isabel passou a ser plantada nas diversas regiões do país, tornando-se a base para o desenvolvimento da vitivinicultura comercial nos Estados do Rio Grande do Sul e de São Paulo. Mais tarde, a partir do início do século XX, o panorama da viticultura paulista mudou significativamente com a substituição da Isabel por Niágara e Seibel. (PROTAS *et al*, 2002 ).

No Estado do Rio Grande do Sul, foi incentivado o cultivo de castas viníferas através de estímulos governamentais. Nesse período a atividade vitivinícola expandiu-se para outras regiões do sul e sudeste do país, sempre em zonas com período hibernar definido e com o predomínio de cultivares americanas e híbridas. Entretanto, na década de 70, com a chegada de algumas empresas multinacionais na região da Serra Gaúcha e da Fronteira Oeste (município de Sant'Ana do Livramento), verificou-se um incremento significativo da área de parreirais com cultivares *Vitis vinifera* (PROTAS *et al*, 2002). Segundo o IBGE (2015), foram produzidos no Brasil 1.507.419 toneladas de uvas e, deste total produzido, o estado de São Paulo corresponde a 157.106 mil toneladas de uvas o que representa 10,4% do total da produção, a região sul, 1.025.475, 68 %, o nordeste 317.904, 21,1 % e a região centro-oeste 6.934, 0,5 % (IBGE, 2014).



Duas características marcantes da vitivinicultura brasileira são a diversidade e a complexidade. Na verdade, temos diversas vitiviniculturas no país, cada uma com sua realidade climática, fundiária, tecnológica, humana e mercadológica (PROTAS, 2003). A videira pertence ao gênero *Vitis*, tendo mais de sessenta espécies, entre as quais a *Vitis vinífera* com 17,12% de hectares plantados, que conta com mais de cinco mil variedades, como Cabernet Sauvignon, Merlot, Chardonnay, Cabernet Franc, Tannat, Ancellota, Pinot Noir e Egiodola, mais expressivas no sul do país, e as espécies *Syrah* e Alicante Bouschet, mais importantes na Região Nordeste (CAMARGO, 2012). As uvas americanas e híbridas representam mais de 80% da produção brasileira de uvas para processamento e têm significativa importância também como uvas de mesa. Cerca de quarenta cultivares entre labruscas, bourquinas e híbridas interespecíficas compõe o elenco varietal brasileiro. As principais cultivares tintas são Isabel, Bordô, Concord, pertencentes à espécie *Vitis labrusca*, com grande aptidão para a elaboração de suco, mas também utilizadas para a produção de vinhos; as cultivares Jacquez, Herbemont e Cynthiana, de *Vitis bourquina*, usadas para vinho e suco; e, Couderc Tinto e Seyve Villard Tinto, híbridas interespecíficas, também usadas para a produção de vinhos e suco (CAMARGO, 2012).

Observa-se na Tabela 1 que o Rio Grande do Sul produziu em 2015, 214.265.429 litros de vinhos e derivados (UVIBRA, 2015), deste total 18 -20% resultam em resíduo da uva (CAMPOS, 2005).

**Tabela 1** - Produção de vinhos

<b>Produto</b>	<b>Quantidade (em lts.)</b>
<b>VINHO DE MESA</b>	195.282.333
<b>VINHO FINO DE MESA (VINÍFERA)</b>	18.982.621
<b>TOTAL DE VINHOS</b>	214.265.429

Fonte: União Brasileira de Vitivinicultura - UVIBRA

A cidade de Jundiaí engarrafa aproximadamente 30 milhões de litros/ano de vinho proveniente do Rio Grande do Sul e produz a partir de uvas da região aproximadamente 300 mil litros/ano. (SINDICATO DA IND. DO VINHO DE JUNDIAÍ, 2014).

A uva é o principal produto agrícola de Jundiaí, sendo cultivada em pequenas áreas e com a elaboração predominante de vinho artesanal, baseada em cultivares americana e

híbrida. No ano de 2007/2008, Jundiaí tinha 284 Unidades Produtoras Agrícolas (UPAs) destinadas a viticultura em uma área total de 2.941,8 ha, sendo 732,1 ha de uva. A destinação principal da produção é para o consumo in natura, sendo uva para mesa em 92,25% das UPAs, para vinho em 5,99% e para suco, 0,35%. Predomina no município a Niágara rosa, plantada em 98,59% das UPAs. As cultivares utilizadas para vinho são a Corbina, Isabel, Máximo e Moscatel (VERDI *et al*, 2010).

A uva *Syrah* é destinada a produção de vinhos tintos jovens. Os produtores de Jundiaí têm se interessado pelo plantio da *Syrah* com o objetivo de obter vinhos de qualidade superior aos cultivares americana. A *Syrah* é uma uva tinta muito bem adaptada aos climas quentes, como o sul da França e com excelente adaptação em terras australianas, para onde foi levada em 1832. Embora com utilização menos expressiva de uva para vinho, viticultores da região de Jundiaí vêm demonstrando interesse na implementação de áreas com uvas que propiciem a obtenção de vinhos de qualidade superior àqueles elaborados na região (ORLANDO *et al*, 2008).

O bagaço da uva é um resíduo industrial obtido a partir do processo de vinificação, sendo composto por semente, casca e engaço da uva e por uma pequena parte do mosto ou do conjunto mosto/vinho que as embebe (CAMPOS, 2005 e MELO 2010).

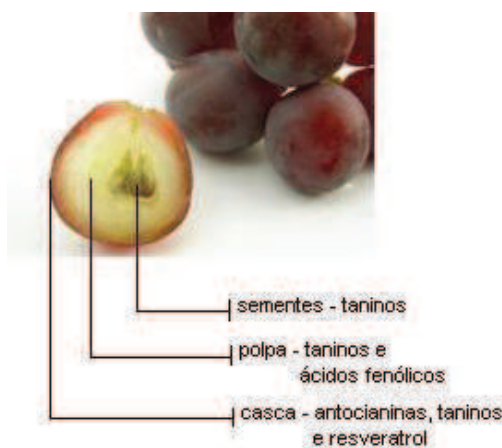
Segundo dados da indústria, durante a produção de 100 litros de vinho tinto, onde se obtém 25 kg de subprodutos do vinho tinto, 17 kg são de bagaço, ou seja, 68%. Atualmente estes subprodutos estão sendo utilizados como ração animal e como adubo de vinhedos favorecendo os sistemas agrícolas familiares e por outro lado permitindo as vinícolas a doação ou venda deste subproduto que é considerado um material poluente quando jogado ao ar livre, impactando o ambiente e, ao alcançar o lençol freático, comprometendo as águas. É também utilizado para fabricação da graspa, minimizando o acúmulo desta biomassa (CAMPOS, 2005).

## **2.2 Composição da uva**

A uva, qualitativamente e quantitativamente possui substâncias muito ricas, em particular os polifenóis, que são antioxidantes naturais, sendo os principais fenólicos

presentes na uva, os flavonoides (antocianina e flavonóis), os estilbenos (resveratrol), os ácidos fenólicos (derivados dos ácidos cinâmicos e benzoicos) e uma larga variedade de taninos (PIRES, 2010), sendo três classes de compostos com características peculiares desempenhando importantes funções no metabolismo das plantas. A composição fenólica é afetada por diferenças de espécies, das condições ambientais e das práticas culturais, região geográfica e vinificação empregada (FLAMINI *et al*, 2013; SHIMA, 2013). Os compostos fenólicos contribuem para a qualidade do vinho e tem efeitos na saúde humana (FLAMINI *et al*, 2013). Entre as frutas, a uva é uma das maiores fontes de compostos fenólicos (SHIMA, 2013). A distribuição dos principais compostos fenólicos nas uvas está representada na Figura 1.

**Figura 1** - Distribuição majoritária dos principais compostos fenólicos na uva.



**Fonte:** Rockenbach (2008).

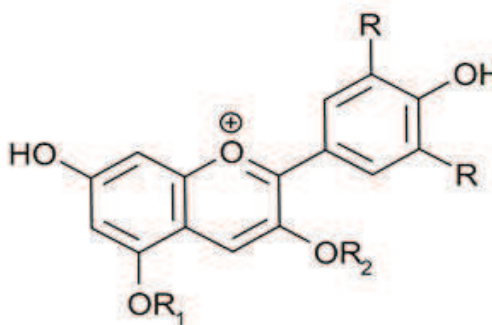
Os flavonóides são importantes pigmentos encontrados na natureza com grande frequência e unicamente nos vegetais. Todos têm uma estrutura  $C_3-C_6-C_3$ , sendo que as partes da molécula com seis carbonos são anéis aromáticos. Os flavonoides são divididos em antocianinas e antoxantinas (BOBBIO e BOBBIO, 2003). Segundo Soares *et al* (2008), as sementes e cascas da uva contém os flavonoides catequina, epicatequina, procianidinas e antocianinas, ácidos fenólicos e resveratrol.

### 2.2.1 Antocianinas

As antocianinas (Figura 2) são responsáveis pelas cores azuis e vermelhas. Estão presentes nas cascas e são responsáveis pela coloração das cascas de uvas tintas (VACCARI,

2009), e segundo Bobbio e Bobbio (2003), as antocianinas são pigmentos responsáveis pelas cores vibrantes das frutas, variando do vermelho vivo ao violeta e azul, são obtidos muito facilmente através de extração a frio com metanol ou etanol fracamente acidificado.

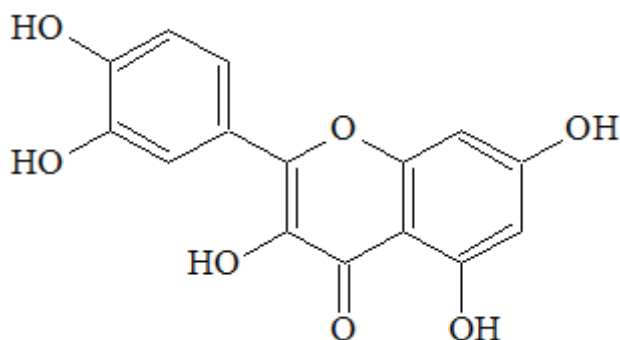
**Figura 2** - Estrutura química das antocianinas



**Fonte:** Freitas *et al* (2013).

### 2.2.2 Antoxantinas

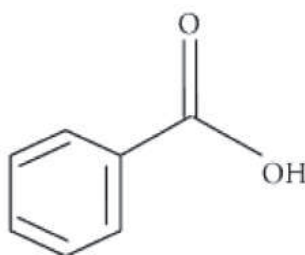
As antoxantinas (Figura 3) compreendem duas classes de compostos, as flavonas e os flavonóis que são os pigmentos mais abundantes responsáveis pela cor amarelada de vegetais e funcionam como a co-pigmentação das antocianinas, mas são fracamente coloridas. Forma com íons férricos complexos de cores fortes, sua estrutura deriva da fenilbenzopirona. Não há diferença significativa entre as flavonas e os flavonóis uma vez que as flavonas são flavonóis onde a posição três da molécula está hidroxilada, mas podem ser facilmente separadas por análise em cromatógrafo, devido às suas propriedades espectróficas (BOBBIO e BOBBIO, 2003).

**Figura 3** - Estrutura química da antoxantina

Fonte: Bobbio e Bobbio (2003).

### 2.2.3 Ácidos fenólicos

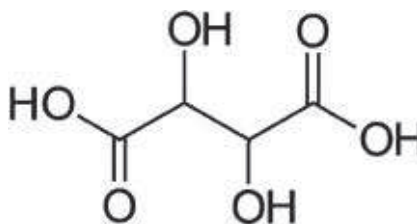
Os ácidos fenólicos englobam o ácido benzoico (Figura 4) e o ácido cinâmico, os quais são encontrados na forma de ácido tartárico (Figura 5), cujas quantidades são influenciadas pelo diferentes cultivares. São considerados metabólitos secundários produzidos pela planta como defesa contra agentes patogênicos de plantas feridas (SAHEL, 2014). De ocorrência natural em animais e plantas, o ácido benzoico é constituinte de muitos alimentos, como frutas (principalmente mirtilo e ameixas), produtos lácteos, canela, cravo, com relatos de concentrações máximas encontradas de 40 mg/kg de alimento (GAVA, 2009).

**Figura 4** - Estrutura química do ácido benzoico

Fonte: Theron e Lues (2009).

O ácido tartárico é o principal composto responsável pela acidez do mosto da uva. A sua presença no mosto está relacionada com aspectos fisiológicos da maturação da uva, com os fatores naturais de clima e solo da região e com as práticas agronômicas da produção. A proporção de ácido tartárico e ácido málico é importante para definir o ponto de maturação da uva e direcionar o sistema de vinificação (RIZZON e SGANGERLA, 2007).

**Figura 5** - Estrutura estereoquímica do ácido tartárico



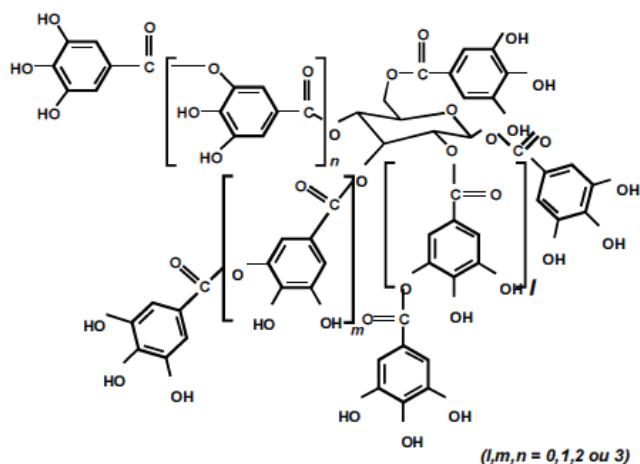
**Fonte:** Miwa (2009).

### 2.2.3 Taninos

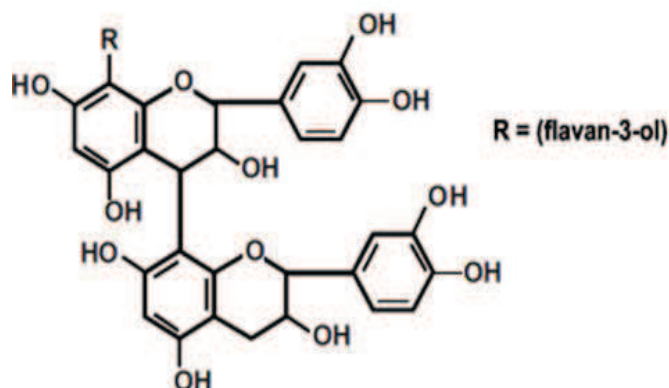
Os taninos são amplamente distribuídos nas plantas, variando do branco ao marrom claro, e na presença de água, formam soluções coloidais de sabor adstringente. Precipitam proteínas e na presença de íons férricos dão soluções pretas azuladas. Com a maturação das frutas a tendência é a perda de taninos. (BOBBIO e BOBBIO, 2003). São classificados em dois grupos, os hidrolisáveis (Figura 6a), constituídos de misturas de fenóis simples e os condensados (Figura 6b), constituídos de unidades de flavonol, são resistentes à hidrólise e solúveis em solventes orgânicos (BATTESTIN, 2004).

**Figura 6** - a) Estrutura química do tanino hidrolisável e b) Estrutura química do tanino condensado

a)



b)



Fonte: Battestin (2004).

#### 2.2.4 Resveratrol

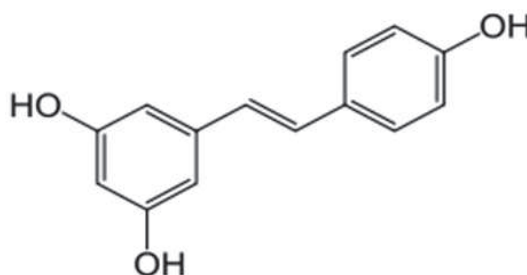
O resveratrol representa, do ponto de vista nutricional, o composto fenólico mais importante do vinho, é encontrado na casca da uva e apresenta atividade bioquímica, como inibidor da agregação plaquetária e coagulação, também apresenta ação anti-inflamatória, regula o metabolismo lipoproteico e age como quimiopreventivo evitando certos tipos de câncer (MORAES *et al* 2010; FLAMINI, 2013; LEE, 2012).

O resveratrol é uma fitolalexina produzida pela videira em resposta a uma situação de estresse contra o ataque de patógenos (SAUTTER, 2005; VACCARI, 2009), mas segundo Flamini (2013), os defensivos agrícolas como os herbicidas e ativadores das plantas, atuam na

videira como indutor na síntese dos polifenóis, sendo a maioria deles fungicidas, mas a influência dos defensivos agrícolas e ativadores na síntese de polifenóis ainda necessitam de mais estudos.

Na molécula de resveratrol encontram-se dois anéis benzênicos, um portando duas hidroxilas e outro apenas uma, caracterizando um polifenol. O resveratrol é sintetizado sob duas formas isoméricas na planta: a forma trans resveratrol e a forma cis-resveratrol. A forma trans resveratrol é fotossensível, sendo transformada em cis na presença de luz visível (SAUTTER, 2005). A presença de uma ligação dupla entre os anéis aromáticos estende a deslocalização eletrônica e leva à possibilidade de isomeria cis e trans. A forma trans (Figura 8) é mais abundante e está localizada na casca da uva (WANG *et al*, 2002).

**Figura 7** - Estrutura química do trans-resveratrol



Fonte: Bastos *et al* (2009).

Sua molécula é uma estrutura com partes polares e apolares, sendo, portanto, solúvel em etanol. Pertence à classe dos estilbenos, predominantemente na semente e na casca da uva (*Vitis vinífera*, americanas e híbridas) podendo haver uma variação considerável nas concentrações em todas as cultivares, devido à região geográfica, às condições de crescimento e às tecnologias de vinificação empregadas. (VACCARI, 2009; GU *et al*, 2013). Encontra-se o resveratrol nos vinhos tintos e suas concentrações são muito variadas concentrando-se nas células da película da uva, por isso seu teor é maior nos vinhos tintos (VACCARI, 2009).

### 2.3 Vinicultura sustentável

Segundo o Relatório Brundtland (WORLD COMMISSION ON ENVIRONMENT AND DEVELOPMENT, 1987) o termo desenvolvimento sustentável é aquele que satisfaz as



necessidades do presente sem comprometer a capacidade das gerações futuras de satisfazerem as suas próprias necessidades. Este tema é um desafio complexo, visto que o agravamento dos impactos ambientais tem consequências econômicas e sociais. A população se torna mais exigente e toma consciência dos problemas gerados pela quantidade de resíduos descartados na natureza, assim como o mundo corporativo, que também tem dado o devido reconhecimento da importância do correto destino aos resíduos (PROGETTI *et al*, 2013). De acordo com Vit (2009), o conceito de sustentabilidade refere-se ao aproveitamento integral e a valorização da matéria-prima e também definido como um processo de eliminação, que até pouco tempo atrás era chamado de rejeitos.

Para relacionar sustentabilidade com a produção de uvas e vinhos, surge um novo termo, "vitivinicultura sustentável" que pela *Oganisation Internationale de la vigne et du Vin*, (OIV) (2008) a definição deste termo é um sistema que combina sustentabilidade econômica dos territórios, produtos com qualidade, segurança e saúde dos consumidores, gerenciando riscos ao ambiente e valorização de aspectos patrimoniais, históricos, culturais, ecológicos e paisagísticos (FLORES e MEDEIROS, 2012).

A sociedade atual está preocupada com a sustentabilidade, há necessidade da intervenção humana com intuito de reduzir ou remediar o impacto ambiental causado pelos resíduos sólidos como, por exemplo, o bagaço da uva que é o principal resíduo gerado do processo de vinificação, proporcionando uma importante estratégia para minimização do impacto ambiental dos mesmos com consequente produção de produtos com valor agregado (BAIL *et al*, 2008).

Os resíduos provenientes da vinificação podem ser matéria-prima para outras atividades como a compostagem (MELO *et al*, 2010), a produção de grapa (RIZZON, 2006) e a produção de fertilizantes, devolvendo à própria videira mais de 50% dos nutrientes retirados, como nitrogênio, fósforo e potássio, os quais são praticamente livres de contaminantes. Com isso, a videira tem condições de ser menos dependente de insumos provenientes do extrativismo e devolver à natureza seus próprios resíduos (FERRARI, 2010).

Em suma, a crescente demanda por alimentos benéficos a saúde vem acompanhada com a preocupação por processos que produzem menos volume de resíduos sólidos ou que os mesmos sejam reaproveitados (VIT, 2009).

## 2.4 Resíduos da Vinificação

Desde o início da história da humanidade as populações utilizavam, para sua sobrevivência, plantas, animais e minerais, os quais eram transformados em alimentos, ferramentas e vestiários. Deste processo resultavam resíduos dos materiais excedentes que eram simplesmente descartados, sendo uma prática admissível, visto que a população era pequena e nômade. O ambiente se encarregava de absorver estes resíduos sem causar impactos ambientais. Durante o processo de industrialização da uva são geradas sobras que se denominam de resíduos podendo ser sólidos ou líquidos (FERRARI, 2010).

De acordo com a Lei nº 12.305, de 2 de agosto de 2010, o conceito de resíduo sólido é:

material, substância, objeto ou bem descartado resultante de atividades humanas em sociedade, a cuja destinação final se procede, se propõe proceder ou se está obrigado a proceder, nos estados sólido ou semissólido, bem como gases contidos em recipientes e líquidos cujas particularidades tornem inviável o seu lançamento na rede pública de esgotos ou em corpos d'água, ou exijam para isso soluções técnicas ou economicamente inviáveis em face da melhor tecnologia disponível.

Na industrialização de produtos provenientes da uva tem-se o vinho, sucos, geleias, uva passa, compotas e cosméticos, que no processo de fabricação geram resíduos sólidos, que na sua maioria são descartados. Na industrialização do vinho e do suco é descartada grande quantidade de resíduo que, apesar de ser aproveitado como compostagem, adubo para a videira e derivados como a grapa, ainda constitui volume considerável. Além disto, descarta-se um resíduo com substâncias bioativas que poderiam ser aproveitadas. A riqueza desses materiais faz deles fontes de antioxidantes (PERIN *et al*, 2011).

Os subprodutos da vinificação são separados durante o esmagamento e a prensagem das uvas e a recuperação destes resíduos pode representar um grande avanço na manutenção do equilíbrio ambiental, visto que, para as vinícolas esta grande quantidade de resíduos é motivo de problemas de armazenagem, transformação ou eliminação em termos ecológicos e econômicos (CZAMANSKI, 2013).

Na Europa a utilização de subprodutos da vinificação é um problema no contexto dos regulamentos recentemente estabelecidos, que instauram medidas contra o descarte de subprodutos do vinho que podem afetar a erosão do solo e sua compactação bem como a

qualidade das águas subterrâneas (CCE, 2006). A quantidade de resíduos gerados, se não forem devidamente tratados causam sérias consequências ao meio ambiente decorrentes da poluição dos solos devido à acidificação e contaminação das águas, pois estes liberam quantidades significativas de efluentes líquidos dispostos no solo, ocasionando baixo rendimento produtivo da lavoura. Estes resíduos possuem grande quantidade de compostos orgânicos, que ao serem lançados no meio ambiente liberam quantidades excessivas de nutrientes como fósforo e nitrogênio podendo causar a eutrofização de ambientes aquáticos (FERRARI, 2010 e CZAMANSKI, 2013). O resultado é a redução do oxigênio dissolvido e consequente morte de microrganismos aeróbios com o desequilíbrio do ecossistema local (CZAMANSKI, 2013). A aplicação do bagaço de uva ao solo sem tratamento apresenta inconvenientes relacionados à biodisponibilidade, devido ao seu alto teor de cobre e manganês, que além de ocasionar fitotoxicidade, liberam metabólitos tóxicos como fenóis, aumentando a quantidade dos metais ao solo proveniente dos tratamentos fitossanitários realizados na vinha. A acidez do solo pode acentuar-se, com reflexos negativos para o desenvolvimento do vegetal e na qualidade da produção (FERNANDES *et al*, 2005).

Caso haja o tratamento biológico do bagaço, como a compostagem, haverá a redução da biodisponibilidade dos agentes tóxicos como o cobre para as plantas, por complexação dos ácidos húmicos que se originam durante a fase de maturação da compostagem (FERNANDES *et al*, 2005).

As substâncias húmicas são reconhecidas como principal componente da matéria orgânica, influenciando as propriedades químicas, físicas e biológicas dos solos. A adição destes compostos no solo pode estimular o crescimento das plantas (OLIVEIRA, 2011). Assim, todos os materiais sólidos provenientes da industrialização da uva e que não tem utilidade constituem resíduos indesejados e são descartados. (FERRARI, 2010).

## **2.5 Tecnologias de reaproveitamento do resíduo**

### *2.5.1 Grappa*

O termo *grappa* (grafia italiana) é de origem germânica. Os diversos dialetos italianos atribuem diferentes grafias à grappa: grapa (Lombardia), rapa (Piemonte), graspa (Vêneto), sendo o termo graspa mais utilizado no Brasil, provavelmente porque os imigrantes italianos

que colonizaram a Serra Gaúcha eram provenientes de Vêneto. A graspa é um subproduto da vinificação e corresponde ao bagaço da uva. A porção nobre do bagaço, para a produção da graspa, é a película que representa aproximadamente 60% do peso do bagaço, enquanto a semente participa com 25% a 30% do peso (RIZZON, 2006).

O processo de fabricação da graspa é a destilação, iniciando-se com a colocação do bagaço e de um determinado volume de água, suficiente para submergi-lo na caldeira do alambique. A proporção de água utilizada, normalmente, é de uma parte de bagaço, para uma parte de água. O calor obtido através da caldeira deve ser mais intenso no início, até quando o destilado começa a sair no condensador. Nesse momento, a intensidade da chama deve ser reduzida e a destilação continuar até quando o alcoômetro assinalar 10°GL. Esse destilado, que corresponde à totalidade do álcool extraído do bagaço, apresenta entre 15°GL e 20°GL de álcool, e deverá ser submetido a uma segunda destilação. O tempo gasto nessa primeira destilação é variável em função do tamanho do alambique, da intensidade da chama e do teor alcoólico do bagaço. O produto obtido na primeira destilação deve ser armazenado em recipiente adequado, até que se obtenha um volume suficiente para efetuar a segunda destilação.

A segunda destilação deve ser feita lentamente, controlando a intensidade do fogo e, conseqüentemente, a vazão do destilado. Nessa fase, para garantir a qualidade da graspa, deve-se obrigatoriamente separar as diferentes partes do destilado, a cabeça, corpo ou coração e cauda. A cabeça é formada pela fração do destilado que sai por primeiro com graduação alcoólica de 75°GL a 70°GL e representa entre 2% e 4% do volume total do líquido da caldeira. São componentes característicos da cabeça o aldeído acético e o acetato de etila. O corpo ou coração do destilado representa a fração que sai do alambique a seguir, com graduação alcoólica de 70°GL até 40°GL. Em volume, o coração representa entre 70% e 80% do destilado. É a porção mais importante do destilado, pois apresenta a maior quantidade de álcool etílico e a menor proporção de componentes secundários como as impurezas e componentes não alcoois. A cauda é formada por compostos voláteis, como o furfural e o lactato de etila. O volume correspondente à porção da cauda representa entre 10% e 20% do volume total do destilado. Concluída a destilação, a porção referente ao corpo ou coração é separada para receber os tratamentos adequados até ser consumida na forma de graspa. As demais partes, referentes à cabeça e à cauda, devem ser armazenadas conjuntamente e depois

redestiladas isoladamente, ou junto com a corrente. A graspa obtida da destilação da mistura, entre as porções de cabeça e cauda, não apresenta a mesma qualidade daquela proveniente da destilação normal (RIZZON e MENEGUZZO, 2006).

### 2.5.2 Compostagem

Outra função dada ao resíduo da uva é a compostagem, que é um processo biológico de transformação de matéria orgânica em substâncias húmicas, sendo a matéria orgânica digerida pelos microrganismos em condições ótimas de temperatura, umidade, aeração, pH e qualidade da matéria prima (EMBRAPA, 2006). Os resíduos orgânicos da uva podem ser usados como fonte única de nutriente ou complementar aos fertilizantes minerais na adubação de implantação, crescimento ou manutenção da videira. Ele é usado em videiras para produção de uvas de mesa e vem sendo utilizado em vinhedos de viníferas destinadas à elaboração de vinhos tintos ou brancos, principalmente orgânicos (MELO *et al*, 2010).

Segundo Melo (2010), não há o conhecimento da melhor forma como o composto orgânico é aplicado no solo e, alguns viticultores, distribuem o composto no interior de covas abertas no mesmo lado das linhas de plantio das videiras ou em lados alternados ao longo dos anos e, com isso, espera-se maior área de contato do solo com o composto, estimulando sua decomposição pelos microrganismos do solo e, por consequência, a liberação de nutrientes, especialmente nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K). No entanto, a abertura de covas provoca o corte de raízes, o que potencializa a ocorrência de doenças como os fungos diminuindo as reservas de substâncias nitrogenadas e os carboidratos (SANHUEZA e SÔNEGO, 1993), e principalmente o declínio do vinhedo devido ao corte das raízes. Outra forma para a aplicação é a distribuição superficial do composto orgânico, que é de baixo custo e contribui com a diminuição de plantas daninhas e a evaporação da água do solo para regiões secas, aumentando a taxa de infiltração de água (MELO *et al*, 2010). A forma de aplicação do composto orgânico, à superfície ou em covas, não afeta a produção de uvas e nem altera o estado nutricional das plantas, nem tampouco a composição do mosto (MELO *et al*, 2012).

## 2.6 Alimentos funcionais

A produção de resveratrol a partir de fontes sustentáveis é desejável devido ao

aumento da demanda destes compostos pelas indústrias farmacêuticas e de nutracêuticos (FLAMINI, 2013). A produção pretendida de resveratrol se alicerça na fabricação de alimentos funcionais (Portaria nº 398, de 30 de abril de 1999-Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde), que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos (CZAMANSKI, 2013). Alimentos funcionais podem ser definidos como qualquer substância ou componente de um alimento que exerce benefício à saúde, incluindo a prevenção e o tratamento de patologias (POLLONIO, 2000 e HASLER 2000).

O interesse por alimentos funcionais disparou na última década com o movimento de cuidado com a saúde, mudanças nos regulamentos de alimentos e comprovações científicas dos benefícios dos alimentos funcionais, fato que tem resultado em uma série de alimentos no mercado, com a função de prevenção de doenças crônicas relacionadas ao envelhecimento (HASLER, 2000).

Segundo a Portaria nº 398, de 30 de abril de 1999-Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, o alimento ou ingrediente que alegar propriedades funcionais ou de saúde pode, além de funções nutricionais básicas, produzir efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica. Para que um alimento ou produto possa ser considerado como funcional deverá respeitar alguns critérios como: exercer ação metabólica ou fisiológica que contribua para a saúde física e para a diminuição de morbididades crônicas; integrar a alimentação usual e os efeitos positivos devem ser obtidos em quantidades não tóxicas, perdurando mesmo após suspensão de sua ingestão.

## **2.7 Propriedades biológicas do resveratrol**

Os estudos do resveratrol iniciaram com Jang *et al* (1996), os quais aplicaram o princípio ativo de forma tópica em ratos para tratamento quimiopreventivo de câncer de pele. Outros estudos já foram realizados com resveratrol na prevenção do câncer utilizando técnicas *in vitro*, e *in vivo*. Estes últimos em menor número devido talvez à pobre biodisponibilidade do resveratrol quando tomado por via oral. O tratamento do câncer com resveratrol depende de vários fatores como o tipo de tumor, a administração e a dose, por isso há pouca evidência de que o tratamento de resveratrol é eficaz para tumores pré-existentes, mas acredita-se na sua

ação na prevenção (CARTER *et al*, 2014).

O resveratrol é uma fonte externa de antioxidantes fundamental para suprimir a resposta inflamatória e defender dos efeitos deletérios do estresse oxidativo. A sua molécula tem fraca solubilidade em água, fator limitante para a dissolução em testes pré-clínicos deste composto. Nas últimas décadas têm sido utilizados sistemas para melhorar a sua biodisponibilidade (LEE *et al*, 2012). Diante deste fato, estudos foram feitos com sistemas de nanopartículas lipídicas para contornar estas desvantagens, os quais mostram a eficiência destas nanopartículas na diminuição dos marcadores tumorais do fígado quando comparado com a administração do resveratrol sem a tecnologia de nanopartículas (LEE *et al* 2012). A engenharia das nanopartículas aumenta a taxa de dissolução em água, melhorando a biodisponibilidade da molécula (HU *et al*, 2004 e RIGON, 2013).

Os trabalhos de Sukla e Sing (2011), concordam com os de Carter et al (2014) no que diz respeito ao número reduzido de estudos com resveratrol *in vivo*, e os resultados desses últimos estudos parecem fragmentados e, por vezes, contraditórios devido à variações nas condições de administração, protocolos e métodos de avaliação. Verifica-se que a presença da matriz, em que o resveratrol é administrado (por exemplo, em álcool ou outros compostos polifenólicos em vinho) ou em determinadas dietas, resulta em discrepâncias entre os estudos. O resveratrol é considerado um suplemento alimentar e uma medicação natural relativamente segura. No entanto, mais investigações são necessárias para determinar os efeitos da administração crônica (SUKLA e SING, 2011).

## 2.8 Radicais livres

Nas últimas décadas foram realizados inúmeros estudos para esclarecer o papel dos radicais livres (RL) em processos fisiopatológicos como arteriosclerose, processos inflamatórios e câncer. Estes estudos mostram o aumento de patologias causadas por radicais livres, sendo este tema cada vez mais importante para elucidar os mecanismos dos RL (CONTIGUIBA, 2013).

Quando os elétrons ocupam a mesma camada de um átomo ou molécula, considera-se que os mesmos estão “pareados” e quando se encontram sozinhos são considerados “não pareados” e a molécula torna-se um radical livre (PÓVOA, 1995). Os radicais livres são



moléculas instáveis que são produzidas a partir da energia recebida de um átomo de oxigênio reativo, que perdeu um elétron de sua camada mais externa. A principal fonte de RL produzidos no organismo são as espécies de  $O_2$  (PÓVOA, 1995 e SAMPAIO *et al*, 2001). A oxidação é parte fundamental do nosso metabolismo, sendo assim, os radicais livres são formados naturalmente ou por uma disfunção biológica (BARREIROS *et al*, 2006). Os RL mais deletérios provêm do oxigênio, particularmente a radical hidroxila (-OH) e o radical superóxido, este último sendo constituído de dois átomos de oxigênio associados com um único elétron não pareado (PÓVOA, 1995). Os radicais livres reagem com substratos biológicos podendo ocasionar danos às biomoléculas afetando a saúde humana e gerando o estresse oxidativo. Os danos mais graves são os causados ao DNA e RNA. Se a cadeia do DNA é quebrada, pode ser reconectada em outra posição, alterando a ordem de suas bases. Esse é um dos processos básicos da mutação e o acúmulo de bases danificadas, podem desencadear a oncogênese. Os polifenóis, em particular o resveratrol possuem estrutura ideal para sequestrar os RL, sendo mais efetivos que a vitamina E e C (BARREIROS *et al*, 2006).

## 2.9 Processo de Secagem

Devido ao tipo de compostos químicos que os bagaços contêm e a instabilidade que seu alto teor de água gera, há a necessidade de diferentes métodos para preservá-los, com a finalidade de prolongar a vida útil do bagaço e realizar o cultivo da vinha de forma que não dependa da temporada (TORRES *et al*, 2009).

Entre os métodos usados na indústria para conservação de alimentos encontram-se os que diminuem a atividade de água como a desidratação e a liofilização, melhorando a estabilidade, minimizando as reações microbiológicas e enzimáticas que acontecem durante o armazenamento (EVANGELISTA, 2005).

### 2.9.1 Desidratação

A secagem como método de desidratação é um dos mais antigos processos empregados e utilizado até os dias atuais. Passou por atualizações nas tecnologias empregadas e tem como finalidade a conservação do produto através da evaporação da água e como resultado terá maior concentração dos nutrientes, apresentando menor redução de peso,



volume e proteção contra a proliferação de microrganismos e alterações enzimáticas no produto (GAVA, 2009).

A secagem pode ser realizada de dois modos, natural ou artificial, através de desidratadores por meio de calor e velocidade de ar controlada (EVANGELISTA, 2005).

Esta secagem pelo calor é produzida artificialmente com temperatura e corrente de ar controlado. O ar é o meio mais utilizado de secagem devida à conveniência e abundância conduzindo calor ao alimento e provocando a evaporação da água. A temperatura e o tempo da desidratação de um alimento dependerão do alimento e da quantidade a ser seca (GAVA, 2009).

### 2.9.2 Liofilização

A liofilização é um processo empregado para a conservação de vários alimentos, permitindo o seu armazenamento por longo período, e diferente do processo de desidratação, mantém as características organolépticas do produto, pois ocorre em condições especiais de pressão e temperatura. Trata-se de um procedimento misto onde se associam congelamento e desidratação (EVANGELISTA, 2005). Liofilização é um processo de separação baseado no fenômeno da sublimação. Este processo tem as seguintes vantagens quando comparado com o processo convencional de secagem: a estrutura do material é mantida, a umidade é removida a baixas temperaturas (reduz as taxas de transporte), aumento da estabilidade do produto durante a estocagem, a minimização de várias reações de degradação devido à fácil transição de material hidratado para desidratado (BOSS, 2004).

O processo de liofilização compreende três etapas, o congelamento, a secagem primária e a secagem secundária ou dessorção, sendo a secagem considerada crítica, pois envolve a correta determinação dos parâmetros de tempo e pressão para a uma melhor qualidade do produto final (METTA, *et al*, 2012).

O congelamento é o primeiro estágio deste processo onde define a forma, o tamanho, a distribuição e a conectividade dos poros na camada seca durante a sublimação. O tamanho dos cristais de gelo formados no congelamento interfere na transferência de massa de vapor de

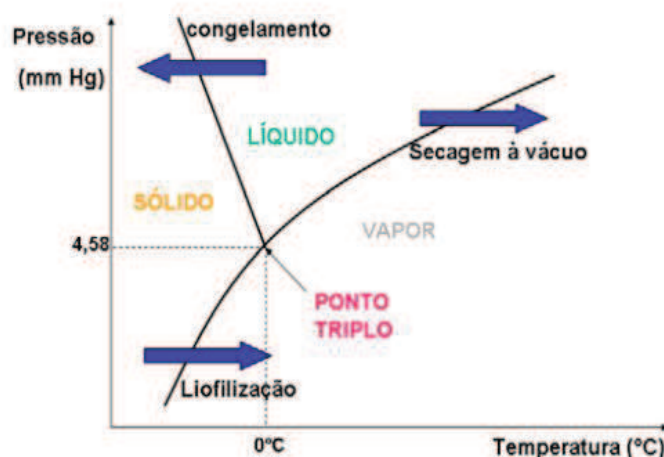
água. Se os cristais de gelo são pequenos e descontínuos, a taxa de transferência de massa de vapor de água pode ser limitada e se forem de tamanhos homogêneos a secagem é mais rápida. O congelamento é um processo de transferência de calor em que os alimentos perdem calor através da superfície de transferência térmica e transferem calor do material para o meio refrigerante. (MARQUES, 2008). Após o congelamento inicia-se o processo de secagem por sublimação. Conforme o gelo sublima, há formação dos poros no interior do produto (BOSS, 2004). Este processo é um fenômeno essencialmente endotérmico e por esse motivo, o calor é fornecido ao sistema durante todo o processo. A água congelada é removida por sublimação, isto requer que a pressão do sistema (liofilizador) no qual o produto está sendo seco seja menor ou próximo à pressão de vapor de equilíbrio da água congelada. A sublimação da água pura terá pressão absoluta de 4,58 torr, assim o material deve ser resfriado abaixo de 0°C para manter a água no estado congelado. O final da secagem primária e início da secagem secundária ou dessorção, acontece quando não existir mais camada congelada, ou seja, não existir a interface da sublimação. Consiste na retirada da água que está ligada à estrutura do material, ocorrendo em uma velocidade menor devido à concentração de umidade ser menor e a água não estar livre. Esta etapa deve acontecer até que a umidade residual seja tão pequena quanto a que o material necessite para manter sua estabilidade por longo período. No caso de alimentos a umidade estará entre 2,0 % a 10% (MARQUES, 2008).

A liofilização requer equipamento especial com alto vácuo, onde o produto perde água, com redução do volume e preservação da sua cor, sabor, aroma e as características nutricionais quase intactas, fato decorrente da formação desta textura porosa (EVANGELISTA, 2005), resultante deste processo, devido a formação de cristais grandes de gelo durante o congelamento (TERRONI *et al*, 2014) no produto. O processo é otimizado pela baixa temperatura e ausência de ar atmosférico (GAVA, 2009). Entretanto, caso o tempo de congelamento seja excessivo há ruptura do material, causando danos estruturais ao mesmo (MARQUES, 2008).

Dependendo das condições de temperatura e pressão, há possibilidade de ocorrer o que é chamado de ponto triplo da água, onde ela se encontra nos três estados ao mesmo tempo. Na temperatura e pressão mais baixas, a fase líquida deixa de existir e a substância passa do estado sólido para o estado gasoso e vice-versa. O diagrama das fases da água (Figura 8) tem fundamental importância no processo de liofilização, sendo uma representação gráfica das propriedades da água em termos de duas variáveis, a pressão e a temperatura. A intersecção

das três linhas ocorre a uma temperatura de 0°C e pressão de 4,58 torr, onde as três fases coexistem. Fornecendo calor a um material em condições abaixo do ponto triplo, a água contida neste produto passará diretamente do estado sólido a vapor, sublimando, caracterizando, nestas condições, à liofilização (METTA *et al*, 2012).

**Figura 8** - Diagrama de fases da água



Fonte: Metta *et al*, (2012).

Após a retirada da água, as atividades das enzimas são inativadas e as reações químicas oxidativas ou não-oxidativas ocorrem em pequena quantidade, trazendo um resultado satisfatório quanto às características organolépticas. A embalagem ideal para o produto liofilizado é sem umidade, com a adição de gases como nitrogênio e o dióxido de carbono. Se corretamente processado e mantido sob condições adequadas, o produto pode ser armazenado por um tempo maior que o processo de desidratação mantendo suas propriedades físico-químicas, biológicas e organolépticas (BOSS, 2004). A liofilização mantém todos os compostos voláteis e fenólicos do bagaço original (EVANGELISTA 2005).

## 2.10 Mutagênese e antimutagênese

Atualmente o homem está em contato com inúmeras substâncias químicas sintéticas. Muitos destes compostos, como os herbicidas utilizados nas plantas, podem trazer transtornos à sociedade, pois cresce o número de evidências de alterações mutagênicas pela exposição a determinados agentes químicos prejudiciais à saúde humana (VARANDA, 2006). Estas

substâncias podem ter efeitos mutagênicos e ou carcinogênicos, isto é, podem induzir mutações no ácido desoxirribonucleico (DNA) ou podem favorecer o desenvolvimento de tumores. Por outro lado, existem também, substâncias que podem anular estes efeitos (ANTUNES *et al*, 2000).

A mutagenicidade é a capacidade de um agente químico ou físico causar alterações genéticas (VARELLA *et al*, 2004). Mutações genéticas atuam em etapas do processo de carcinogênese, onde uma célula normal é convertida em célula maligna, sendo que os agentes indutores deste processo são denominados de carcinógenos. Para o desenvolvimento de um tumor maligno é necessária a exposição repetida aos carcinógenos. (LOUREIRO *et al*, 2002; VARANDA, 2006).

O termo antimutagenicidade é utilizado para descrever agentes que reduzem a frequência de mutações espontâneas ou induzidas (WATERS *et al*, 1990). Atualmente substâncias endógenas advindas da alimentação ou sintetizadas pelas células, exibem algum tipo de atividade inibitória para agentes mutagênicos naturais e artificiais (ODIN, 1997). Os estudos com agentes antimutagênicos iniciaram nos anos cinquenta, porém recentemente é que os grupos de pesquisas têm se concentrado na identificação destes agentes, principalmente de origem natural como, a cúrcuma, *Agaricus brasiliensis* (cogumelo) (ANTUNES *et al*, 2000) (SOUZA, 2007), o própolis verde (ROBERTO, 2009) e resveratrol (CARTER, 2014).

## 2.11 Bioensaios de genotoxicidade e mutagenicidade

Os biomarcadores são úteis e podem ser definidos como sistemas indicadores que geralmente incluem um organismo completo, usado para identificação de um alvo específico (SILVA e PEG, 2003).

Sistemas testes vegetais como o de *Vicia faba*, *Zea mays*, *Tradescantia* sp e principalmente o de *Allium cepa*, têm sido utilizados para o estudo e detecção de genotoxicidade (GRANT, 1994). Esses sistemas também têm importância no monitoramento da poluição ambiental e avaliação do potencial mutagênico de muitos compostos químicos puros (MA *et al*, 1995).

Fiskesjö (1985) ressaltou a importância e a utilidade de sistemas testes vegetais na avaliação de riscos de genotoxicidade e enfatizou que apesar das diferenças entre os metabolismos de plantas e animais, há também similaridades, e que a ativação de pró mutagênicos em plantas possui alta relevância, pois seres humanos consomem plantas tratadas com agentes químicos.

O método de avaliação de alterações cromossômicas em raízes de *Allium cepa* é validado pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, OMS) e o Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) como um eficiente teste para análise e monitoramento *in situ* da genotoxicidade de substâncias ambientais ou químicos puros (CABRERA e RODRIGUEZ, 1999).

O sistema de teste de *Allium cepa* é bem aceito, por exemplo, para o estudo de efeitos de citotoxicidade de plantas medicinais, porque as suas raízes ficam em contato direto com o agente químico. Por esta razão, entre os vegetais superiores, a planta *Allium cepa* é indicada como um eficiente organismo-teste de genotoxicidade e mutagenicidade devido às suas determinadas características, como sua cinética de proliferação, crescimento rápido de suas raízes, grande número de células em divisão, sua alta tolerância a diferentes condições de cultivo, sua disponibilidade durante o ano todo, seu fácil manuseio e por possuir cromossomos em número reduzido e de grande tamanho (FISKESJÖ, 1985; GRANT, 1994), além de seu baixo custo (LEME e MARIN-MORALES, 2009). Esta espécie tem sido utilizada, com sucesso, na avaliação de químicos, sendo eles substâncias puras ou misturas complexas (FISKESJÖ, 1985; MA *et al*, 1995; MAZZEO *et al*, 2010 VENTURA-CAMARGO *et al*, 2011).

A análise de micronúcleos serve como teste de mutagenicidade e é um dos poucos métodos diretos para mensurar danos em sistemas expostos a agentes mutagênicos potenciais e o teste de *Allium cepa* tem sido amplamente empregado com esse propósito (SILVA e PEG 2003). O índice mitótico e o índice de germinação são usados como indicadores de proliferação adequada das células (GADANO, 2002) o que também pode ser medido através deste bioensaio.

Desta forma, o presente trabalho trará contribuições quanto ao manejo e aplicação sustentável do resíduo da vinicultura, apresentando uma proposta de otimização do processo de preservação do composto no bagaço. A avaliação da atividade anti-câncer atribuída ao

resveratrol (CARTER, 2014), por meio de ensaio *in vitro*, contribuirá para o conjunto de dados experimentais a cerca da atividade biológica deste princípio ativo.

### 3 METODOLOGIA

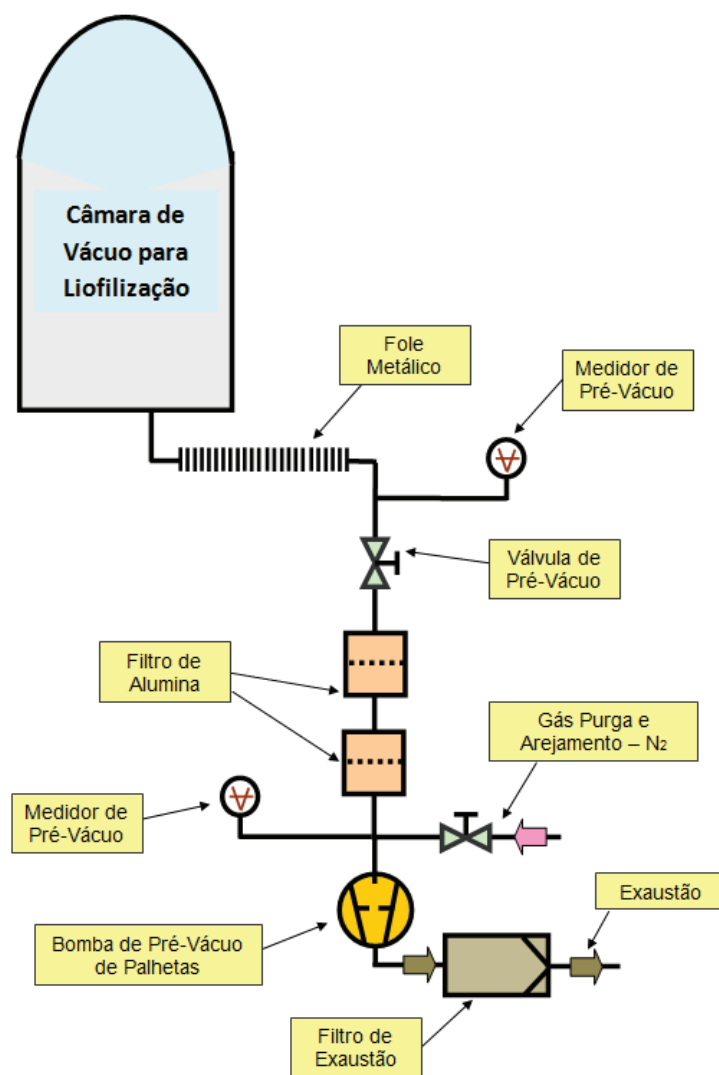
#### 3.1 Obtenção do bagaço

##### Material utilizado

- Desidratador Pardal PE14, com circulação de ar e temperatura
- Liofilizador: composto de uma câmara de vácuo de vidro (campânula de vidro), um medidor de pressão, um condensador, um fole metálico, um filtro, uma bomba mecânica de palhetas e válvulas, instalados sob uma bancada fixa.
- Seladora manual M200mm
- Determinador de umidade por infravermelho IV 2500 GEHAKA

A Figura 9 mostra o esquema do liofilizador. Basicamente constam de uma câmara de vácuo, um filtro, uma bomba de vácuo e um filtro de exaustão. O sistema de pré-vácuo é baseado em uma câmara de vácuo com vedações convencionais em elastano (borracha nitrílica) e com bomba de pré-vácuo do tipo mecânico de palhetas de duplo estágio. Devido ao fato de a bomba mecânica de palhetas não ser eficiente para o bombeamento de vapores – no caso da liofilização realizada o vapor de água deve ser removido – deve-se proteger a bomba de vácuo com a instalação de filtros capazes de reter o vapor de água. Para tornar a retenção de vapor de água mais eficiente, foram instalados dois filtros de alumina ao longo da linha de bombeamento. Há ainda a colocação de fole metálico para acoplar mecanicamente as partes do sistema de vácuo (câmara de vácuo e linha de bombeamento) e uma válvula de pré-vácuo para isolar a linha de bombeamento da câmara de vácuo, para a troca de amostras a serem liofilizadas. Os medidores de vácuo utilizados são do tipo Pirani. É necessário um filtro de exaustão para que a sala da experiência não fique contaminada com vapor de óleo proveniente da bomba mecânica de palhetas (esta bomba de vácuo é lubrificada a óleo mineral). Ao término do processo de liofilização, o arejamento da câmara de vácuo é feito com gás nitrogênio.

**Figura 9** - Sistema de vácuo para liofilização de alimentos



**Sistema de Vácuo para Liofilização de Alimentos.**

**Fonte :** Laboratório de Tecnologia do Vácuo- Fatec São Paulo

O processo de liofilização compreende três etapas, o congelamento, a secagem primária e a secagem secundária, envolvendo a correta determinação dos parâmetros de tempo e pressão para a uma melhor qualidade do produto final (METTA, *et al*, 2012).

### 3.2 Amostras

As amostras de bagaço de uva *Syrah* foram cedidas pelo produtor Antonio Pizzolante, plantadas no bairro Traviú em Jundiá, São Paulo, Brasil e colhidas no dia 20 de julho de 2014. As amostras ficaram armazenadas na geladeira por quatro dias, sob refrigeração de 6-10°C. Após o quarto dia fez-se o desengace. As uvas foram esmagadas em esmagadeira

manual para quebra das bagas.

### *3.2.1 Insumos adicionados a 80 kilos de uva*

- 80g de Ácido Tartárico;
- 16 g de levedura dissolvida em mosto;
- 500g de açúcar cristal.

Após a adição dos insumos, a casca ficou em fermentação por oito dias, fazendo-se a descuba, separando a parte sólida da parte líquida. Após a descuba, a parte sólida foi prensada em prensa vertical descontínua, marca AGM máquinas, com capacidade para 30 kilos de uva.

## **Desidratação**

Com o objetivo de preservar as propriedades dos resíduos, os mesmos foram acondicionados em caixas sendo encaminhadas imediatamente para o laboratório, onde foram armazenados à temperatura de 8°C em geladeira, até uso. No dia seguinte, 3,0 kilos de bagaço foram submetidos à desidratação em desidratador Pardal a temperatura de 50° C por 5 horas para preservar a amostra, determinada a umidade final em equipamento analisador de Umidade por infravermelho IV 2500 GEHAKA e embalados em sacos de polietileno e fechados em seladora. Após este processo para preservar a amostra foram congelados a -18°C em freezer até uso.

## **Liofilização**

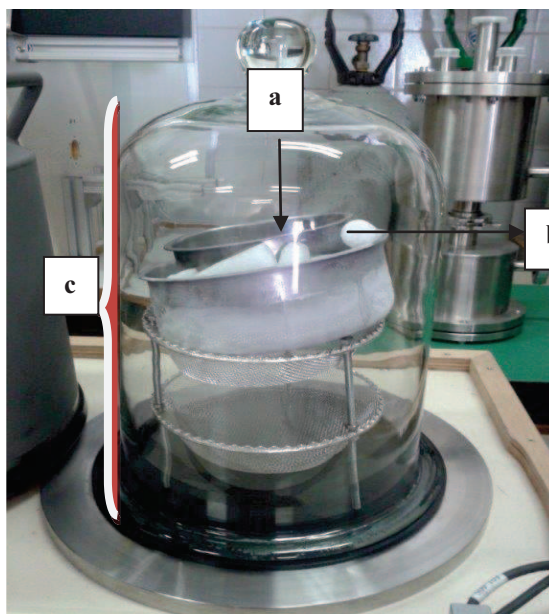
Foram liofilizados 30 gramas de bagaço, por 12 horas à temperatura de -20 °C e pressão inicial de  $3,1 \times 10^{-1}$  torr no liofilizador (Figura 10). A umidade final foi determinada no equipamento analisador de Umidade por infravermelho IV 2500 GEHAKA. O equipamento foi ajustado para a temperatura de 125°C com o tempo de leitura de 5 minutos e aquecimento prévio de 30 minutos. Após a estabilização do equipamento, as amostras foram



submetidas à leitura colocando-se 5 gramas da amostra para cobrir toda a área do prato de alumínio.

O restante do bagaço in natura foi congelado em freezer e armazenado a  $-18^{\circ}\text{C}$ .

**Figura 10** – Foto do Liofilizador desenvolvido no laboratório de vácuo- a) Bagaço, b) gelo seco e c) câmara de vácuo



Fonte: a autora

O produto resultante da secagem e liofilização está representado na Figura 11.

**Figura 11** - Secagem pelos dois métodos empregados, explicação física para alteração na cor do bagaço



Fonte: a autora

### 3.3 Extração do resveratrol

#### 3.3.1 Material Utilizado

- Reagentes:

Álcool Metílico ( $\text{CH}_4\text{O}$ ), PM 32,04 g/mol, marca Lafan

Acetato de etila ( $\text{C}_4 \text{H}_8 \text{O}_2$ ), PM 88,11 g/mol, marca Neon

Bagaço de uva desidratado

Bagaço de uva liofilizado

- Equipamentos e vidrarias:

Centrífuga Excelsa baby FAMEM

Capela de exaustão

Balão de 500 ml

Balão de 250 ml

Condesador

Manta aquecedora

Tubo de ensaio com rosca

Termômetro

Luva

Determinador de umidade por infravermelho, Gehaka Modelo- IV2500

#### 3.3.2 Método de extração

O protocolo utilizado foi segundo Liu *et al* (2012), com modificações. Foram realizadas 3 extrações em duplicata do composto bruto para o material desidratado e 4 extrações em duplicata para o material liofilizado.

Pesou-se 1 g. de bagaço após desidratação, aos quais foram adicionados 5 mL de

solução solvente de metanol e 5 mL de acetato de etila. Os compostos fenólicos foram extraídas no escuro por 24 horas à temperatura ambiente, após este período foram centrifugadas em centrífuga a 1000 rpm por 15 minutos, o sobrenadante foi evaporado até secagem em destilador, por 03 horas a temperatura de 50°C. O resveratrol seco foi suspenso em 2 mL de metanol e congelados a -18°C até o momento da análise.

O mesmo processo descrito acima foi realizado com o bagaço que foi liofilizado.

### 3.4 Caracterização e quantificação do resveratrol

#### Material Utilizado

##### •Reagentes:

Acetonitrila ( $C_2H_3N$ ) a 25%, PM 41,05 g/mol e concentração mínima 99%, Carlo Erba

Ácido sulfúrico 0,2 N,

Padrão farmacêutico resveratrol ( $C_{14}H_{12}O_3$ ) XI GREE-LIFE NATURAL PRODUCTS, PM 228,25 g/mol e 99,3% de pureza

Extrato de resveratrol suspenso em metanol desidratado

Extrato de resveratrol suspenso em metanol liofilizado

##### •Equipamentos e vidrarias:

Cromatógrafo HPLC SPD 10A SHIMADZU e HPLC Surveyor Termo Scientifics

Espectroscópio FTIR, Agilent Cary 630

Tubo de ensaio

### Cromatografia

Os extratos de resveratrol foram analisados em um cromatógrafo High Performance Liquid Chromatography (HPLC), equipado com detector UV-VIS e coluna C18 de 250 mm de comprimento, 4 µm de diâmetro de partícula e 60 mm de diâmetro interno segundo método de

Seferin *et al* (2000), com modificações. Foram injetados 20 µL do padrão resveratrol, e na sequência, as amostras desidratadas e liofilizadas foram filtradas em filtro Millipore 0,22µm e detectados em 306nm. A análise por HPLC foi conduzida em eluição isocrática com fluxo de 0,5 mL/min, tempo de retenção de 30 minutos e pressão de 68 bar, utilizando acetronitrila a 25% com pH 3,0 ajustado com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

## **Espectroscopia**

A espectroscopia no infravermelho determina grupos funcionais de uma amostra, sendo que cada grupo absorve em frequências características. Elas apresentam vibrações específicas, que podem ser de estiramento ou de deformação, as quais correspondem a níveis de energia da molécula (OLIVEIRA 2011).

Os espectros no infravermelho podem ser obtidos a partir de amostras sólidas, líquidas e gasosas. A qualidade desses espectros depende do método de preparo da amostra e do tipo de acessório utilizado para sua obtenção. Os métodos mais empregados envolvem transmitância e refletância, sendo este último muito utilizado para análises qualitativas e quantitativas. O método por refletância pode apresentar acessórios para a obtenção de espectros por Refletância Total Atenuada (ATR), Refletância Especular e Refletância Difusa (SKOOG *et al*, 2002).

Como uma “impressão digital”, cada molécula tem espectro característico na região do infravermelho, tornando o método viável para identificar diferentes tipos de amostras (análise qualitativa). Os picos presentes no gráfico do espectro correspondem às frequências de vibrações entre os átomos que compõem cada amostra. A altura desses picos corresponde à quantidade de determinada amostra (análise quantitativa) (MORGANO *et al*. 2005). O espectrofotômetro com transformada de Fourier expõe a amostra a um único pulso de radiação e de medidas de resposta. O sinal resultante, chamado de indução bifásica é uma medida direta da coerência temporal da luz. Como o sinal medido no interferômetro não pode ser interpretado é necessário à técnica matemática chamada de Transformação de Fourier. Esta transformação é realizada pelo computador (algoritmos de software), apresentando ao usuário as informações desejadas para a análise espectral (MORGANO *et al*, 2005).

Os extratos foram analisados através de espectroscopia de absorção em equipamento

Fourier Transform Infrared (FTIR), que identificou os picos correspondentes aos grupamentos químicos da molécula de resveratrol na amostra, comparando-se estes picos com o padrão. Os picos apresentados representam a “impressão digital” do resveratrol.

### 3.5 Bioensaio de *Allium cepa*

#### 3.5.1 Material utilizado

- Reagentes

Água purificada

Álcool 70%

Carnoy((3 partes de etanol para 1 de ácido acético – v:v)

Extrato de resveratrol

HCl 1N

Trifluralina, 0,84ppm

Reativo de Schiff

Carmin acético 2%

Sementes de *Allium cepa* (cebola)

- Equipamentos e vidrarias:

Estufa

Laminas de vidro

Microscópio

Placas de Petri

Estes testes foram feitos de acordo com o protocolo proposto por Ma *et al* (1995), com modificações. Sementes de *Allium cepa* (2n = 16 cromossomos) de um mesmo lote e mesma variedade *baia periforme*, foi o material biológico utilizado neste estudo, para avaliação dos efeitos antimutagênicos dos extratos de resveratrol.

Sementes de *Allium cepa* foram submetidas à germinação (100 sementes/placa), em

placas de petri, com papel de filtro embebido em 2,0mL de água purificada (controle negativo), resveratrol a 0,5ppm + trifluralina; resveratrol a 1,0ppm + trifluralina; resveratrol a 2,0ppm + trifluralina e trifluralina (controle positivo), a 25°C até que as raízes atingissem, aproximadamente, 1,5 cm de comprimento. Após 3 dias, as sementes germinadas foram contadas e o índice de germinação foi calculado em porcentagem.

O índice de germinação das sementes de *Allium cepa* foi calculado segundo a fórmula (1)(ROBERTO 2009):

$$IG = \frac{n \text{ de raízes germinadas}}{n \text{ de raízes não germinadas}} \times 100 \quad (1)$$

Após a determinação do IG, as raízes foram coletadas e colocadas em frascos tipo Falcon, contendo o fixador Carnoy (3:1, ácido acético e álcool) por 24 horas. Após este tempo são separadas das sementes e recolocadas em Carnoy e mantidas em geladeira.

Para preparo das raízes, as mesmas foram hidrolisadas com HCl 1N, por 10 minutos a 60°C, em banho-maria, para hidrólise da parede de celulose.

Após nova lavagem em água destilada, as raízes foram submetidas ao reativo de Schiff por, aproximadamente, 2 horas, em ausência de luz. Com os meristemas corados e lavados em água corrente, foram confeccionadas 5 lâminas de cada tratamento, para a avaliação de possíveis presenças de aberrações cromossômicas e micronúcleos, levando-se em conta a porcentagem de ocorrência de cada uma delas. A montagem das lâminas utilizou um fragmento da porção meristemática e outro da porção F<sub>1</sub> das raízes, os quais foram macerados entre lâmina e lamínula com uma gota de carmim acético. Em cada lâmina foram analisadas, aproximadamente, 500 células da região meristemática. Quando este número foi excedido, o valor foi corrigido, matematicamente, para 500 células, totalizando exatas 5.000 células por tratamento. Este mesmo procedimento foi utilizado para a análise das células da geração F<sub>1</sub>. A observação foi feita em microscopia óptica, sob o aumento de 400x.

Para a análise dos efeitos mutagênicos e antimutagênicos sobre as células meristemáticas, foram observadas e anotadas todas as ocorrências de micronúcleos e mitoses anormais. Para a geração F<sub>1</sub>, considerou-se apenas o número de micronúcleos. Para os efeitos genotóxicos foram observados os possíveis tipos de aberrações cromossômicas encontradas

nas células meristemáticas. Todos estes tipos de aberrações (brotos nucleares, células binucleadas, células poliplóides, aderências cromossômicas, C-metáfases, perda de cromossomos, pontes cromossômicas, anáfases multipolares e com ponte) foram computados num único grupo, que foi denominado IG.

### 3.6 Determinação do efeito antimutagênico

A atividade antimutagênica foi avaliada pela análise da porcentagem de redução de danos para cada um dos tratamentos com os extratos de resveratrol. Para determinar esta porcentagem, foi utilizada a seguinte fórmula (2) (ROBERTO 2009):

$$\text{Redução(\%)} = \frac{a - b}{a - c} \times 100 \quad (2)$$

Onde: a = número de células micronucleadas ou com quebra cromossômica presentes no controle positivo;

b = Número de células micronucleadas ou com quebra cromossômica presentes nos tratamentos;

c = número de células micronucleadas ou com quebra cromossômica presentes no controle negativo.

### 3.7 Análise Estatística

Para os resultados das extrações, medições de rendimento e umidade e a concentração de resveratrol a análise empregada foi o teste “t” de student. Para as comparações entre os grupos de tratamento para atividade anti-mutagênica, foi utilizado o teste Anova *oneway*, seguido do pós-teste de Bonferroni através do programa GraphPad Prism versão 5,0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

## 4 RESULTADOS

Os resultados obtidos neste estudo são descritos a seguir:

Oitenta quilos de uva foram processados no início do trabalho e após a descuba, resultaram em 55 litros de vinho e 15 quilos de casca prensada (bagaço), ou seja, 18,8% do total de uva utilizada foram convertidos em bagaço.

#### 4.1 Secagem do bagaço

A secagem do bagaço da uva ocorreu a partir de duas formas, a desidratação e a liofilização, ambos os processos foram utilizados para preservar a amostra, retirando-se a água que poderia acelerar a sua deterioração.

Após a secagem, os teores de umidade foram, em média,  $11,0 \pm 0,3\%$  (n=3), para a secagem por estufa. Para a liofilização, os valores foram  $8,1 \pm 1,0\%$  (n=4). Observa-se uma aparente vantagem para o método de liofilização, no que diz respeito a esta característica, porém não se obteve diferença significativa entre os dois processos (Tabela 2 e Figura 12).

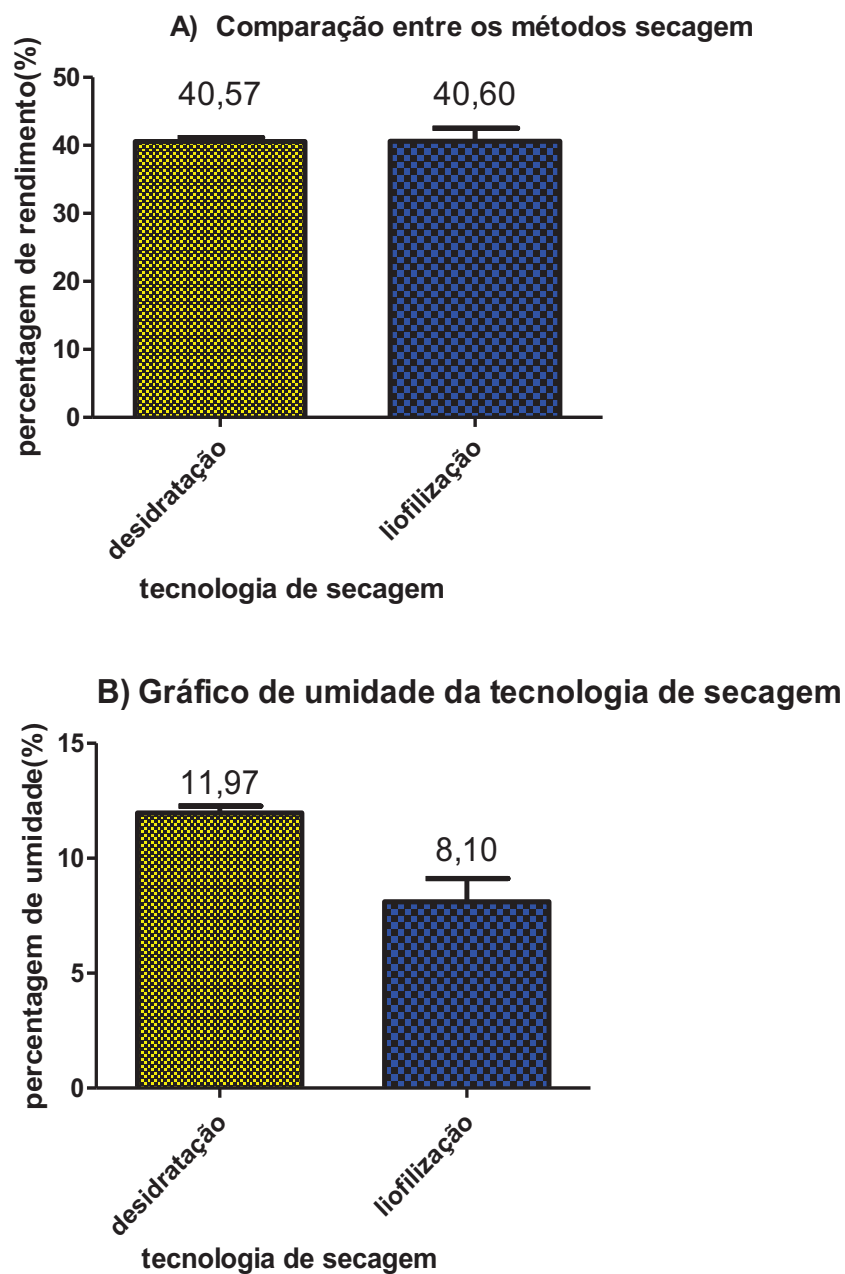
Após a secagem, o rendimento foi, em média, respectivamente de  $40,0 \pm 1,2\text{g}$  (n=3) e  $41,1 \pm 2,6\text{ g}$  (n=4), de composto fenólico por grama de bagaço, respectivamente, para a secagem em desidratador e para a liofilização.

**Tabela 2** – Comparação de rendimento de secagem e umidade entre os métodos de conservação do Bagaço

Amostra	Desidratação (%)	Umidade(%)	Liofilização(%)	Umidade(%)
1	41,7	11,4	38,1	7,30
2	40,0	12,4	46,3	11,1
3	40,0	12,1	39,0	7,5
4			39,0	6,5
$\mu \pm \text{DP}$	$40,6 \pm 0,6$	$12,0 \pm 0,3$	$40,6 \pm 1,9$	$8,1 \pm 1,0$



**Figura 12** – Comparação entre os métodos de secagem A) rendimento secagem e B) umidade. Não há diferença significativa entre os tratamentos



Veja o tamanho das fontes dos títulos em A e em B, são bem diferentes, mas agora acho que não compensa arrumar.

Vamos arrumar para o artigo.

A análise estatística não mostrou diferença significativa entre as amostras quanto ao rendimento ou o teor de umidade para ambos os processos empregados.

Após a extração, o rendimento foi, em média, respectivamente de  $0,8 \pm 0,1$  g (n=6) e

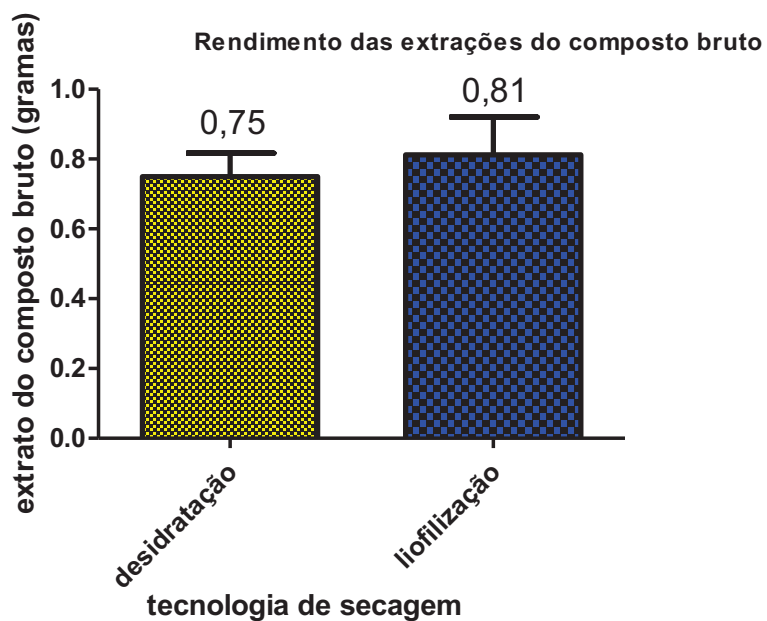
$0,8 \pm 0,1$  g (n=8), de composto fenólico por grama de bagaço, respectivamente, para a secagem em desidratador e para a liofilização.

A Tabela 3 e o gráfico da Figura 13 mostram a comparação do rendimento do composto fenólico nos dois métodos estudados.

**Tabela 3** - Comparação das extrações do composto bruto

Extrações	Rendimento das extrações do composto (g/1g)	
	Desidratação	Liofilização
1	0,8	0,5
	0,5	0,7
2	0,9	0,7
	0,9	0,4
3	0,8	1,1
	0,6	1,3
4		0,8
		1,0
$\mu \pm DP$	$0,7 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,1$

**Figura 13** - Comparação entre média dos rendimentos das extrações do composto bruto

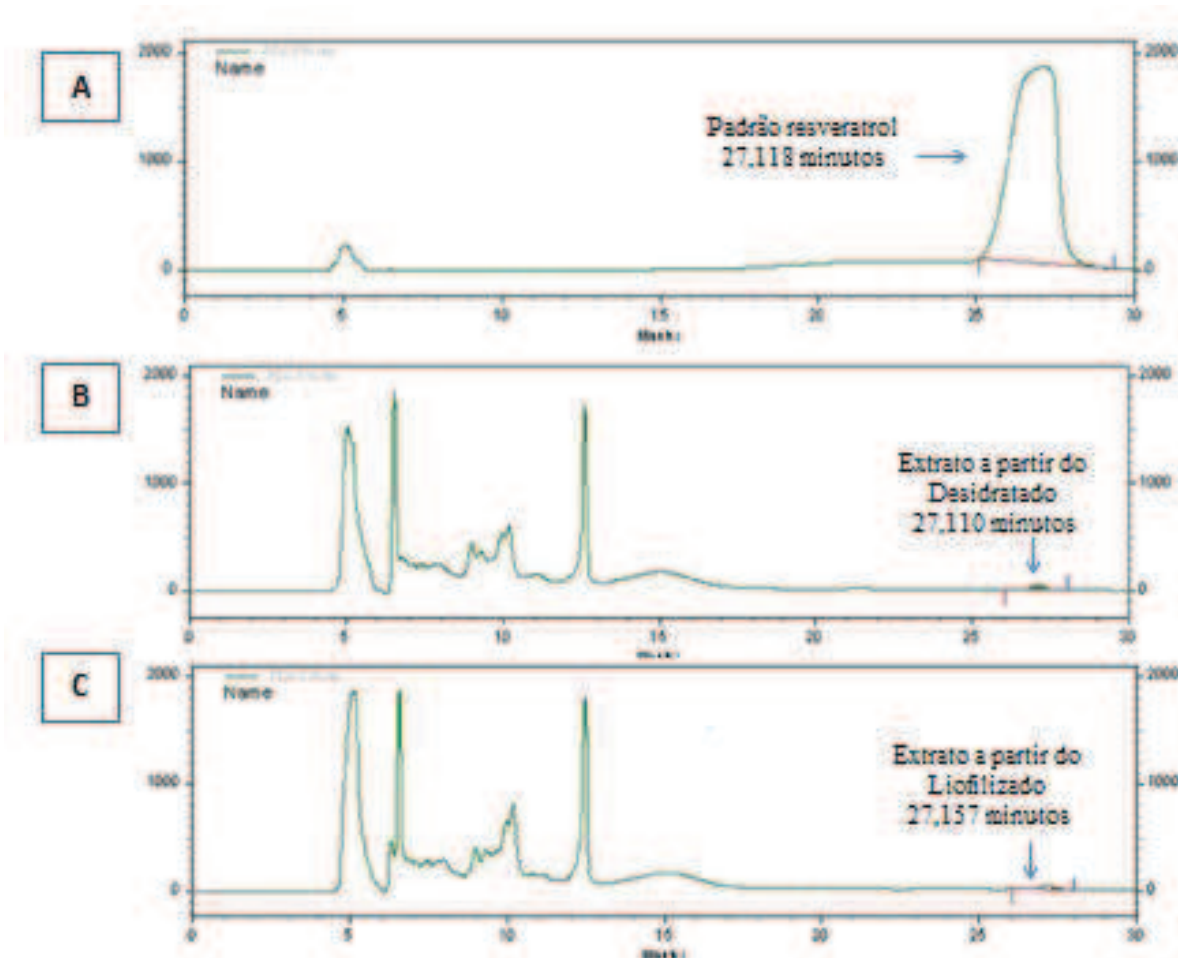


A análise estatística não mostrou diferença significativa entre as amostras quanto ao rendimento do composto fenólico para ambos os processos empregados. A natureza dos constituintes dos compostos fenólicos não foi determinada, uma vez que esta análise não foi objeto deste estudo, mas sim, a quantificação do conteúdo de resveratrol do composto.

#### **4.2 Análise por cromatografia**

A quantificação do resveratrol no extrato fenólico foi realizada por meio da técnica HPLC. A identificação do resveratrol foi baseada na comparação dos seus tempos de retenção com padrão do princípio ativo da XI GREE-LIFE NATURAL PRODUCTS, gentilmente doado pela farmácia “Ao Farmacêutico”. A partir do padrão farmacêutico de resveratrol, obteve-se no cromatograma o pico com tempo de retenção de 27 minutos (Figura 14A). A presença do resveratrol nas amostras foi demonstrada pela obtenção dos picos com tempo de retenção de 27 minutos para a amostra originada do extrato fenólico proveniente do bagaço desidratado (Figura 14B) e de 27 minutos para o recíproco proveniente do bagaço liofilizado (Figura 14C).

**Figura 14** - Cromatograma das amostras de extrato e padrão. Em A) padrão resveratrol; B) extrato a partir do desidratado e C) extrato a partir do liofilizado



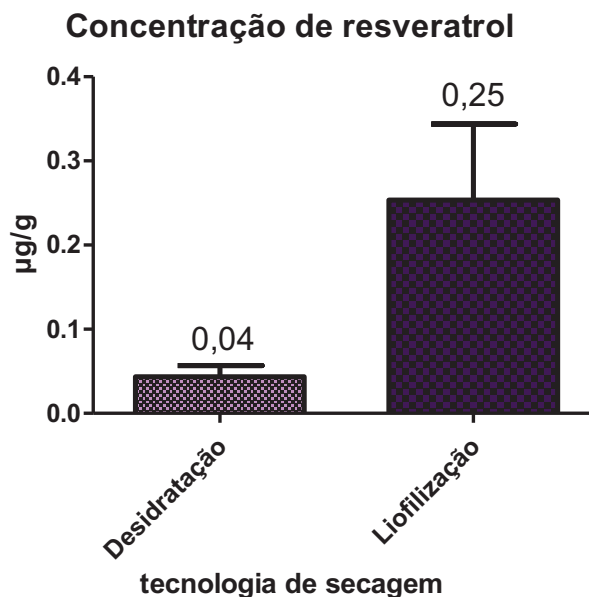
Fonte: a autora

Em relação à concentração de resveratrol observa-se na Tabela 4 e figura 15, que o bagaço liofilizado resultou em concentração maior de resveratrol sendo 0,25  $\mu\text{g/g}$ , quando comparado com o bagaço que foi desidratado resultando em 0,04  $\mu\text{g/g}$ . Neste caso, a diferença foi significativa entre os processos quanto à concentração de resveratrol.

Tabela 4 - Concentração de Resveratrol em  $\mu\text{g/g}$

Amostras	Desidratação( $\mu\text{g/g}$ )	Liofilização( $\mu\text{g/g}$ )
1	0,07	0,38
2	0,03	0,60
3	0,03	0,24
4		0,26
5		0,03
6		0,01
$\mu\pm\text{DP}$	0,04 $\pm$ 0,01	0,25 $\pm$ 0,09

**Figura 15** - Comparação da concentração de resveratrol nos métodos de secagem empregados.



\*,  $P < 0,05$

O bagaço liofilizado foi superior na concentração do extrato de resveratrol. Observa-se, ainda, que após o final dos processos, a cor do material foi melhor preservada quando resultante da liofilização. Embora se trate de um parâmetro subjetivo, este fato pode ser decorrente da não exsudação de material bioativo neste processo de preservação da amostra, visto que no processo de sublimação, a água passa do estado sólido para o gasoso sem passar pelo estado líquido.

A observação das características organolépticas dos extratos está apresentada na Tabela 5.

**Tabela 5** - Parâmetros qualitativos dos extratos

Variáveis	Desidratação	Liofilização
Concentração de resveratrol µg/g	menor	maior
Umidade %	maior	menor
Preservação dos compostos no congelamento	menor	maior

A Tabela 6 abaixo apresenta os dados consolidados dos resultados das análises comparativas entre os processos. A diferença significativa entre os processos se destaca no rendimento do princípio ativo, resveratrol, com vantagem para a liofilização.

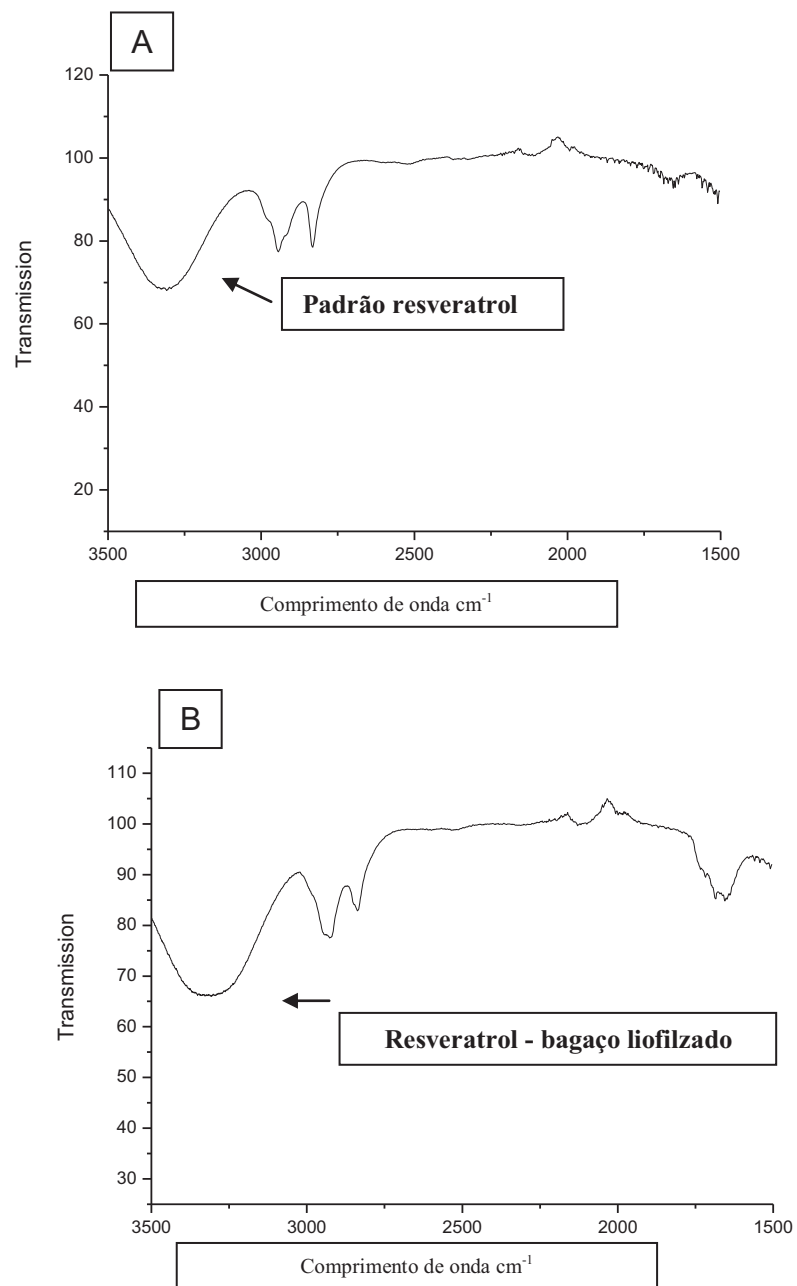
**Tabela 6** - Dados consolidados dos parâmetros quantitativos dos extratos

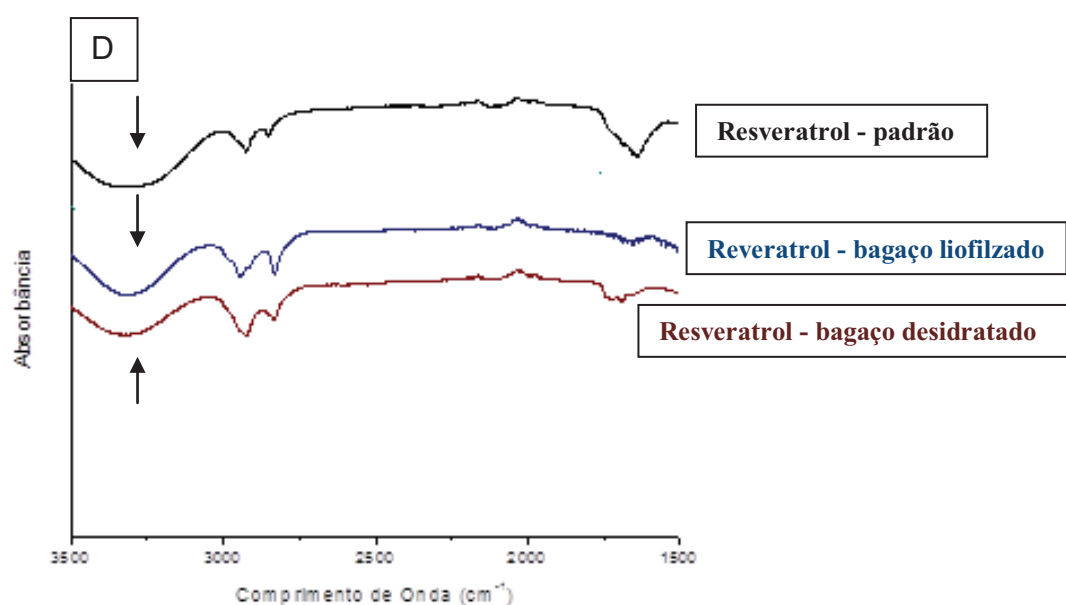
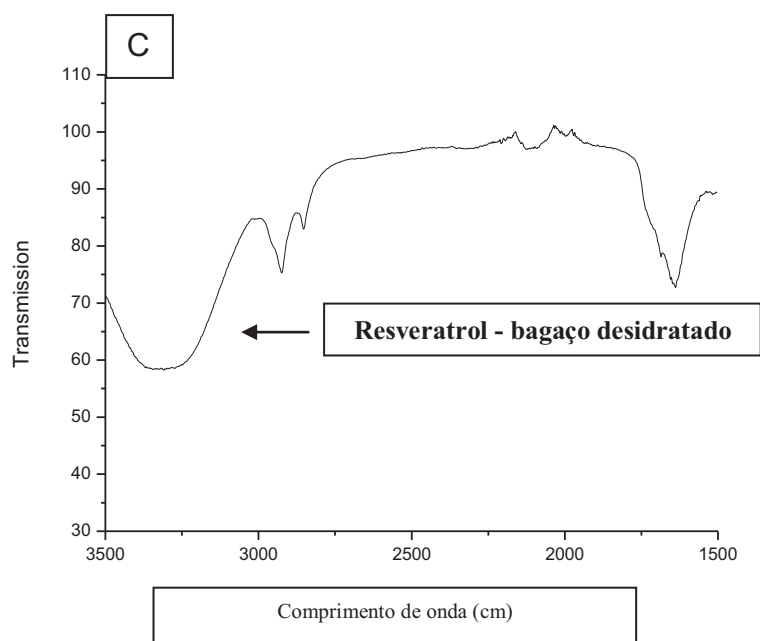
Variáveis	Desidratação	Liofilização
Concentração de resveratrol (µg/g)	0,04	0,25
µ±DP	0.04± 0.01	0.25 ± 0.09
Umidade %	11,97	8,10
µ±DP	<b>12± 0,3</b>	<b>8,1± 1,0</b>

### 4.3 Análise qualitativa por FTIR

A análise por FTIR foi realizada inicialmente a fim de se comprovar a presença de resveratrol nas amostras. Observa-se presença das bandas de absorção entre 3000 e 3500 cm<sup>-1</sup>. Na figura 16 A, encontra-se o padrão diluído, a B, o resíduo liofilizado, na C, o resíduo desidratado e na figura D, a inserção das amostras. Nossos resultados corroboram os achados de Mendes *et al.*(2012), em cujo trabalho o resveratrol puro foi detectado na banda de 3257 cm<sup>-1</sup>.

**Figura 16** - Espectroscopia em A) padrão de resveratrol diluído; B) bagaço liofilizado, C) bagaço desidratado e D) agrupamento de amostras





Fonte: A autora

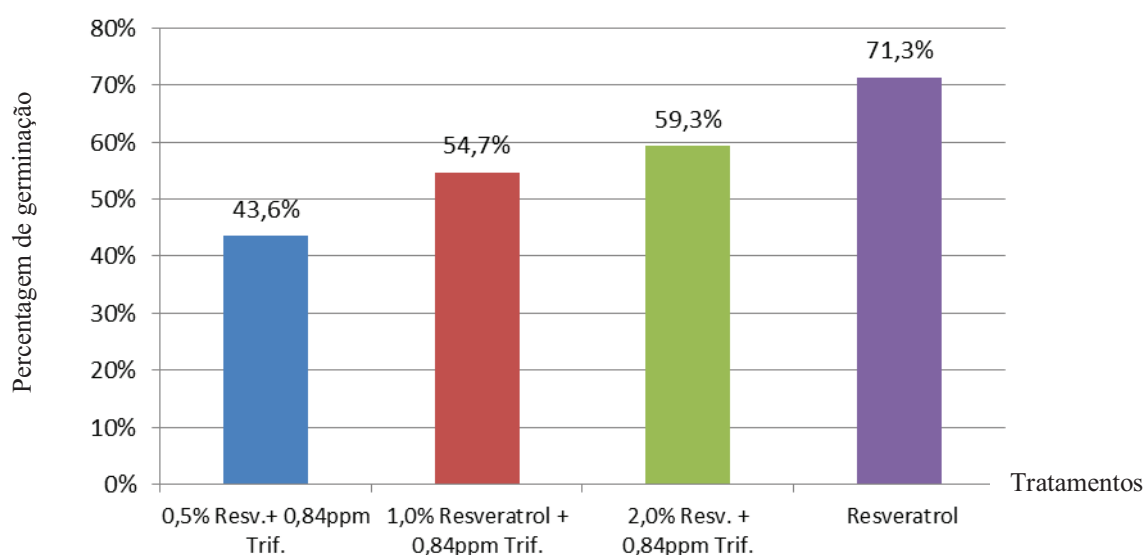
#### 4.4 Avaliação da atividade biológica do resveratrol: bioensaio de *Alium cepa*

A avaliação da ação do resveratrol sobre a germinação das sementes mostrou um efeito positivo e dependente de concentração, quando se comparou a exposição das sementes a um agente tóxico conhecido (trifluralina) e ao resveratrol. A Tabela 7 e a figura 17 mostram estes resultados, observa-se uma atenuação do efeito inibitório da trifluralina.



**Tabela 7** - Índice de germinação:efeito positivo do resveratrol sobre a inibição da germinação pela trifluralina

Tratamentos	Índice de Germinação
0,5% Resveratrol + 0,84ppm Trifluralina	43,6%
1,0% Resveratrol + 0,84ppm Trifluralina	54,7%
2,0% Resveratrol + 0,84ppm Trifluralina	59,3%
Resveratrol	71,3%

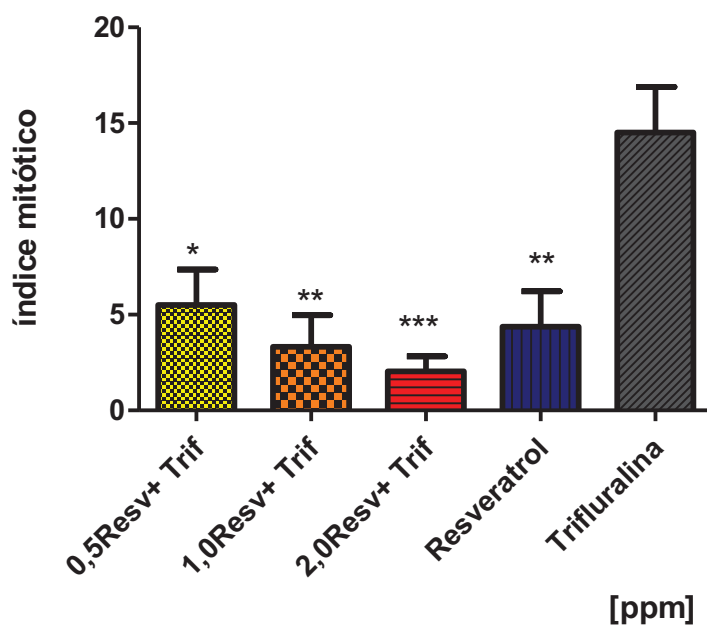
**Figura 17-** Índice de Germinação

Com relação aos efeitos sobre a ação genotóxica e mutagênica da trifluralina, também se observou uma atenuação destes efeitos, tanto quando se mediu o índice mitótico (Figura 18), quanto quando se avaliou a mutagênese pelo índice de micronúcleo (IMN) (Figura 19).

Quando se calculou a redução dos efeitos mutagênicos, conforme descrito no item 3.5 do método, obteve-se uma redução de 90,97% para o resveratrol a 0,5 ppm e 95% para 1 ppm e 2,0 ppm. A redução foi proporcional à concentração até 1 ppm do composto, a partir da qual há uma estabilização do efeito, isto é, não há efeito benéfico adicional. O efeito sobre a genotoxicidade e mutagenicidade induzidas pela Trifluralina estão demonstrados nas Figuras 18 e 19, respectivamente.

**Figura 18** - Atividade anti-genotoxicidade do resveratrol sobre a trifluralina

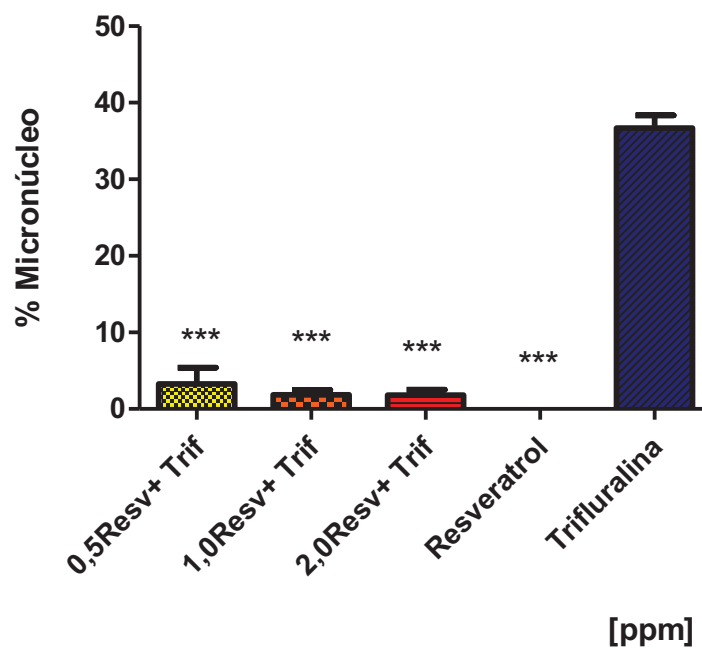
### Atividade anti-genotoxicidade do Resveratrol



\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$

**Figura 23** - Atividade antimutagenicidade do resveratrol sobre a trifluralina

### Atividade anti-mutagenicidade do Resveratrol



\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$

## 5 DISCUSSÃO

Neste trabalho foram estudadas metodologias para avaliar comparativamente métodos de preservação do resveratrol a partir do resíduo da vinicultura, com proposta de otimização do aproveitamento do resíduo da vinicultura, além de confirmar a atividade anti-mutagênica atribuída ao composto, como contribuições à extensa literatura existente.

A redução de água livre do alimento eleva a pressão osmótica de seu meio e, conseqüentemente, a proliferação de microrganismos é contida, além disso, enzimas que provocam alterações por processo de oxidação perdem sua atividade (EVANGELISTA, 2005). A secagem, portanto, preserva dois parâmetros fundamentais para que o bagaço preserve suas características químicas e microbiológicas.

Neste estudo, a retirada da água do bagaço foi realizada por dois métodos e os produtos gerados estão demonstrados na Fig.12. Os resultados obtidos mostraram que não houve diferença significativa entre os valores de umidade e rendimento do composto fenólico resultantes dos dois processos de conservação empregados. Observou-se, contudo, que o método de liofilização resultou em uma maior preservação da cor do bagaço e do aspecto geral do produto. Embora seja uma avaliação subjetiva, esta observação representa um aspecto relevante na qualidade do produto final. No presente trabalho, portanto, após o término dos processos, estes dois parâmetros foram melhor preservados pelo processo de liofilização. Em que pese que estas características não se relacionem diretamente com o princípio em estudo, uma vez que as antocianinas são as responsáveis pela cor, elas indicam que o processo de liofilização apresenta vantagens na preservação da cor e textura

Os métodos analíticos de determinação de compostos como o HPLC e o FTIR são importantes métodos de separação que encontram aplicação em todos os ramos da ciência. Compreendem um grupo diversificado e importante de métodos que permitem separar os componentes que são muito semelhantes em misturas complexas. Muitas dessas separações são impossíveis por outros métodos com alta resolução, eficiência e sensibilidade (SILVA, 2012). Neste estudo o HPLC apresentou dados qualitativos e quantitativos, isto é, identificou a presença do composto e forneceu sua concentração nas amostras obtidas. O FTIR foi empregado na análise qualitativa, confirmando a presença do resveratrol nas amostras obtidas.

Com relação à análise de FTIR, nota-se que os picos encontrados nas amostras possuem a mesma frequência do pico do padrão farmacêutico do resveratrol. Mendes *et al*(2012), encontraram a assinatura do resveratrol na mesma faixa de comprimento de onda obtida neste estudo, qual seja, entre 3000 a 3500  $\text{cm}^{-1}$ , o que confirma a presença do resveratrol nas amostras desidratadas e liofilizadas. Esta análise fornece resultados rápidos e precisos na determinação estrutural de substâncias complexas, de fácil execução e baixo custo relativo.

A quantificação do resveratrol, por meio da HPLC, (Tabela 8), indicou que a liofilização apresentou maior rendimento ( $0.25 \pm 0.09 \mu\text{g/g}$ ) do que a desidratação ( $0.04 \pm 0.01 \mu\text{g/g}$ ). Neste caso, o processo de liofilização se mostrou significativamente mais eficiente na preservação do composto. Para Careri *et al*, 2003, o bagaço da uva variedade *Nero D'Avola* apresentou 6,0  $\mu\text{g/g}$  de resveratrol, para Sato (2012) o valor encontrado foi de 7,6  $\mu\text{g/g}$  para uva Alicante e 6,4  $\mu\text{g/g}$  para uva *Syrah*, mesma variedade deste estudo. As diferentes condições ambientais, espécies e práticas culturais, região e vinificação empregada (FLAMINI *et al*, 2013; SHIMA, 2013) poderiam explicar as diferenças encontradas, embora este último autor tenha realizado a extração a partir das bagas da uva e com outro solvente, diferente do utilizado neste trabalho.

A liofilização, sendo um processo a frio, protege contra a degradação dos compostos fenólicos, em contraste aos fornos de secagem. (TORRES, 2009). Segundo este autor a secagem acima de 60° C diminui significativamente a atividade dos polifenóis em amoreira (*Morus alba L.*) e considera que a liofilização pode ser uma opção para as indústrias de alimentos para melhorar a cor e aroma de uvas pobres em antocianinas.

Com relação aos bioensaios, Fiskejő, (1985), demonstrou a importância do sistema de *Allium cepa* para a avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade de compostos e misturas, podendo ser prospectado a outros organismos, como os mamíferos, por possuir sistemas enzimáticos semelhantes. O *Allium cepa* se apresenta como um modelo eficaz, com alta sensibilidade.

O presente trabalho demonstrou o potencial anti-genotóxico e anti-mutagênico do resveratrol no modelo de *Allium cepa*, em relação à trifluralina, conhecido herbicida de ação clastogênica (FERNANDES, 2005). Após o tempo de exposição de 72 horas, observou-se significativa redução dos efeitos genotóxicos/mutagênicos da trifluralina (Figura 20 e 21). Os

efeitos do resveratrol sobre a ação genotóxica e mutagênica da trifluralina podem ser decorrentes de uma atividade antioxidante, principalmente devido à habilidade aceptora de radicais livres que danificam o DNA, como anteriormente demonstrado em própolis verde (ROBERTO 2009).

Os resultados obtidos pela avaliação do índice de germinação, demonstraram que também neste caso, houve efeito redutor do resveratrol sobre a ação inibitória da trifluralina e, este efeito foi proporcional à dose testada. A redução foi proporcional à concentração do resveratrol, até 1 ppm, após a qual não houve efeito adicional. A concentração de 1 ppm foi o valor tomado como referência a partir dos estudos *in vitro* de Carter (2014), com células bacterianas.

Em conjunto, os resultados permitem dizer que a extração do resveratrol em larga escala, utilizando método de liofilização, se mostra como uma alternativa viável para otimização da sua preservação na utilização do resíduo da vinificação. O ensaio com *Allium cepa*, permitiu confirmar os efeitos biológicos descritos para o resveratrol, quanto à sua atividade anti-mutagênica, corroborando com a vasta literatura existente atribuindo propriedades protetoras do resveratrol (FISKEJÖ, 1985; WATERS, 1990; FERNANDES, 2005; MORENO, 2009; VENTURA-CAMARGO *et al*, 2011).

## 6 CONCLUSÕES

Observa-se que os resíduos da vitivinicultura analisados possuem o composto resveratrol, que foi preservado nos dois métodos de conservação utilizados – desidratação e liofilização. Os resultados foram confirmados através de análise cromatográfica (HPLC) e de espectroscopia FTIR.

Há que se considerar ainda, que, em se tratando de tempo de processamento, enquanto a desidratação requereu quatro horas para a secagem, a liofilização necessitou de vinte e quatro horas nas condições experimentais utilizadas. Desta forma, a liofilização, por ser uma técnica mais demorada, pode significar um impacto negativo, quando se considerar apenas o maior gasto energético. No entanto, em termos de rendimento de princípio ativo, o método se mostra significativamente mais eficaz.

Com relação à antimutagenicidade do resveratrol os resultados permitem concluir que o resveratrol desempenha um importante papel como mediador das atividades antimutagênicas, revertendo a mutagenicidade da trifluralina. Estes conhecimentos vêm corroborar com dados já existentes na literatura, bem como contribuir como subsídios a estudos complementares que contribuem com a indicação deste composto como potencial uso terapêutico em terapias alternativas ou complementares.

## 7 REFERÊNCIAS

ANTUNES, L.M.G.; ARAÚJO, M.C.P. **Mutagenicidade e Antimutagenicidade dos Principais Corantes para Alimentos**. Revista de Nutrição, Campinas, v.13, p. 81-88, maio/agosto 2000.

BAIL, S., STUEBINGER, G., KRIST, S., UNTERWEGER, H., BUCHBAUER, G. **Characterisation of various grape seed oils by volatile compounds, triacylglycerol composition, total phenols and antioxidant capacity**. Journal Agriculture Food Chemistry, 01/06/2008. <Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814607012253>>. Acesso em: 20 de maio de 2014.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. **Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo**. Quím. Nova vol.29 n°1 São Paulo Jan./Feb. 2006. Disponível em:< [https://www.google.com.br/search?q=configurando+email+da+etec&oq=CONFIGURA&aqs=chrome..69j69j59j0l2j69i60j0.3896j0j4&sourceid=chrome&es\\_sm=93&ie=UTF-8#newwindow=1&q=CONFIGURAR+outlook+no+email+da+etec+2014](https://www.google.com.br/search?q=configurando+email+da+etec&oq=CONFIGURA&aqs=chrome..69j69j59j0l2j69i60j0.3896j0j4&sourceid=chrome&es_sm=93&ie=UTF-8#newwindow=1&q=CONFIGURAR+outlook+no+email+da+etec+2014)> Acesso em: 02 de novembro de 2014.

BASTOS, D. H. M.; ROGERO, M. M.; ARÊAS J.A. **Mecanismos de Ação de Compostos Bioativos dos Alimentos no Contexto de Processos Inflamatórios Relacionados à Obesidade**. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia, São Paulo, v.53, n 05, julho 2009. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-27302009000500017](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27302009000500017)> Acesso em 27 de maio de 2014.

BATTESTIN V.; MATSUDA L.K.; MACEDO G.A. **Fontes e Aplicações de Taninos e Tanases em Alimentos**. Revista Alim. Nutr., Araraquara, v.15, n.1, p.63-72, 2004. Disponível em: <<file:///C:/S%3%ADlvia/MESTRADO/ARTIGOS,%20DISSERTA%C3%87%C3%95ES/artigos%20utilizados/tanino%20estrutura.pdf>>. Acesso em: 03 de novembro de 2014.

BOBBIO, P.A.; BOBBIO, F.O. **Introdução á química de Alimentos**. 3ª ed. São Paulo: Varela, 2003. 223 p.

BOSS, E.A. **Modelagem e otimização do processo de liofilização: aplicação para leite desnatado e café solúvel**. 2004,129 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Estadual de Campinas, Campinas. Disponível em:< <file:///C:/Users/Silvia/Downloads/BossEdinaraAdelaide.pdf>>. Acesso em 15 de julho de 2015.

BRASIL. **Lei Nº 12.305, de 2 de Agosto de 2010**. <Disponível em [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2007-2010/2010/Lei/L12305.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2010/Lei/L12305.htm)>. Acesso em 03 de maio de 2014.

CABRERA G.L, RODRIGUEZ D.M.G. **Genotoxicity of soil from farmland irrigated with wastewater using three plant biossays**. Mutation Research, 19 de maio de 1999.

CAMARGO, U.A. **Árvore do conhecimento-uva para processamento**. Embrapa Ageitec, 2012. Disponível em:< [http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/uva\\_para\\_processamento/arvore/CONT000g5f8](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/uva_para_processamento/arvore/CONT000g5f8)

cou802wx5ok0bb4szwyx060i6.html >. Acesso em 06 de março de 2016.

CAMPOS A. T., **Embrapa Agronegócio do Leite**. <Disponível em [http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01\\_255\\_217200392410.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_255_217200392410.html) >. Acesso em 03 de maio 2014.

CAMPOS, L. **Obtenção de extratos de bagaço de uva Cabernet Sauvignon (Vitis vinifera): parâmetros de processo e modelagem matemática**. 2005. 123 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. Disponível em <[http://www.pgeal.ufsc.br/files/2011/01/Tese\\_Luanda\\_09\\_04\\_05\\_CBA.pdf](http://www.pgeal.ufsc.br/files/2011/01/Tese_Luanda_09_04_05_CBA.pdf)>. Acesso em 20 de maio de 2013.

CARERI, M.; CORRADINI, C.; ELVIRI, L.; NICOLETTI, I.; ZAGNONI, I. **Direct HPLC analysis of quercetin and trans resveratrol in red wine, grape, and winemaking byproducts**. J. Agric. Food Chem., 2003.

CARTER L.G.; D'ORAZIO J. A.; PEARSON K. J. **Resveratrol and Cancer: Focus on *In Vivo* Evidence**, Lexington, USA, p. 44, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24500760>>. Acesso em: 25 de maio de 2014.

CCE. Comissão das Comunidades Europeias. **Para um sector vitivinícola sustentável**. Comunicação da Comissão ao Conselho e ao Parlamento Europeu (PT)319. Bruxelas, 2006. Disponível em < [http://ec.europa.eu/commission\\_2010-2014/president/news/speeches-statements/pdf/20110504\\_pt.pdf](http://ec.europa.eu/commission_2010-2014/president/news/speeches-statements/pdf/20110504_pt.pdf) >. Acesso em: 04 de maio de 2014.

CLUBE DOS VINHOS, (CV) **Viticultor e vinicultor: o que faz cada um**. 2014. Disponível em: <<http://www.clubedosvinhos.com.br/viticultor-e-vinicultor-o-que-faz-cada-um/>>. Acesso em: 05 de Março 2015.

CONTINGUIBA, G.G.; SILVA, J.R.N.; AZEVEDO, R.R.S.; ROCHA, T.J.M.; SANTOS, A.F. **Método de Avaliação da Defesa Antioxidante: Uma Revisão de Literatura**. Revista Cient Ciênc Biol. Saúde, Alagoas, 2013. Disponível em: <<http://revistas.unopar.br/index.php/biologicas/article/view/460/443>>. Acesso em 02 de novembro de 2014.

CZAMANSKI, R.T. **Prospecção de atividade antibacteriana em resíduos da viticultura na perspectiva da desinfecção e antissepsia aplicadas à saúde e à produção animal, bem como à agricultura familiar**, 2013, 191 f. Doutorado-Porto Alegre-RS. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/79477/000901694.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 21 de setembro de 2014.

Embrapa Uva e Vinho, Janeiro de 2003. Disponível em: <<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/UvaAmericanaHibridaClimaTemperado/>>. Acesso em 06 de março de 2016.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de Alimentos**. 2ª ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 2005.

FERNANDES, A.; COSTA, M.; VASCONCELOS, C.; PINTADO, M. **A compostagem de bagaço de uva com vista à obtenção de corretivos orgânicos e suportes de cultura de qualidade** In: V Congresso Ibérico de Ciências, Porto, 2005. Disponível em: <<http://www.drapn.min->



agricultura.pt/drapn/conteudos/laboratorio/Baga%C3%A7osVCICHcomunicActas.pdf>. Acesso em: 21 de setembro de 2014.

FERNANDES, T.C.C. **Investigação dos Efeitos Tóxicos, Mutagênicos e Genotóxicos do Herbicida Trifluralina, Utilizando *Allium Cepa* e *Oreochromis Niloticus* como Sistemas-Testes**. 2005 211 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2003. Disponível em<  
[http://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/87698/fernandes\\_tcc\\_me\\_rcla.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/87698/fernandes_tcc_me_rcla.pdf?sequence=1&isAllowed=y)> Acesso em: 15 de agosto de 2015.

FERRARI, Valdecir. **A Sustentabilidade da Vitivinicultura Através de Seus Próprios Resíduos**, 2010, 26 f. Dissertação – Bento Gonçalves RS. Disponível em<  
<http://www.ufrgs.br/agronomia/materiais/userfiles/ArtigoResiduodeuva.pdf>>. Acesso em: 20 de maio de 2013.

FISKESJÖ, G. **The Allium test as a standard in the environmental monitoring**. Hereditas, março de 1985, v.102 p 99 -112.

FLAMINI, R., MATTIVI, F., ROSSO, M.; ARAPITSAS, P.; BAVARESCO, L. **Advanced Knowledge of Three Important Classes of Grape Phenolics: Anthocyanins, Stilbenes and Flavonols**; International Journal of Molecular Sciences, Itália, 27 Setembro 2013.

FLORES S.S.; MEDEIROS, R.M.V. **Perspectivas Teórico Metodológicas para Compreender a Vitivinicultura Sustentável e Novas Territorialidades na Vitivinicultura**. In: XXI ENCONTRO NACIONAL DE GEOGRAFIA AGRÁRIA, 2012, Uberlândia, MG. p.1-18.<Disponível em:  
[http://www.lagea.ig.ufu.br/xx1enga/anais\\_enga\\_2012/gts/1220\\_1.pdf](http://www.lagea.ig.ufu.br/xx1enga/anais_enga_2012/gts/1220_1.pdf)> Acesso em: 06 de junho de 2014.

FRANKEL, E.N.; GERMAN, J.B.; KINSELLA, J.E.; PARKS, E.; KANNER, J.; **Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine**. THE LANCELOT, fevereiro de 1993.

FREITAS, A.; SANTOS, S.L.L.; LIRA, F.L.C.; MELO, E.J.M.V.C.F.; OLIVEIRA, L.C.F.; FREITAS, M.L.; FREITAS, J.D.; FREITAS, A.J.D.; SOUZA, J.S. **O Experimento da Extração da Antocianina Presente no Repolho Roxo como Motivador da Aprendizagem em Química** In: 11º Simpósio Brasileiro de Educação Química, 2013, Teresina, PI. Disponível em: <http://www.abq.org.br/simpequi/2013/trabalhos/2092-12945.html>>. Acesso em: 02 de novembro de 2014.

GADANO A, GURNI A, LÓPEZ P, FERRARO G, CARBALLO M. **In vitro genotoxic evaluation of the medicinal plant *Chenopodium ambrosioides***. J Ethnopharmacol, junho de 2002.

GAVA, A. J.; BENTO, C. A.; FRIAS, J. R. G. **Tecnologia de alimentos: princípios e aplicações**. 2ª ed. São Paulo: Nobel, 2009.

GRANT, W.F. **The present status of higher plant bioassays for detection of environmental mutagens**. Mutation Research, 16 de outubro de 1994.

GU J.; AHN-JARVIS J.H, RIEDL K.M, SCHWARTZ S.J, CLINTON S.K, VODOVOTZ Y.J. **Agric Characterization of Black Raspberry Functional Food Products for Cancer Prevention Human Clinical Trials**, Journal Food Chemistry, 27 de dezembro de 2013.

HARBORNE J.B., WILLIAMS, C; A. **Advances in flavonoid research since 1992**. Revista Elsevier, Reading, Novembro de 2000. <Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942200002351>> Acesso em: 20 de maio de 2014.

HASLER, C.M. **The Changing Face of Functional Foods**. Journal of the American College of Nutrition Volume 19, Supplement 5, junho de 2000.

HU, J.; Johnston, K. P.; Williams, R. O. **Nanoparticle engineering processes for enhancing the dissolution rates of poorly water soluble drugs**. Drug Dev. Ind. Pharm. 2004, 30, 233–245. Disponível em: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1081/DDC-120030422.short>>. Acesso em: 21 de setembro 2014.

HUBER K.; QUEIROZ J.H.; MOREIRA A.V.B.; RIBEIRO S.M.R. **Caracterização Química Do Resíduo Agroindustrial Da Manga Ubá (Mangifera indica L.): Uma Perspectiva para a Obtenção de Antioxidantes naturais**, Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial, Ponta Grossa, 2012. Disponível em< [revistas.utfpr.edu.br/pg/index.php/rbta/article/.../807](http://revistas.utfpr.edu.br/pg/index.php/rbta/article/.../807) >. Acesso em: 03 dez. 2013.

IBGE. **Banco de Dados Agregados-SIDRA** <Disponível em <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=1618&z=t&o=26&i=P>>. Acesso em: 06 de março de 2016.

JANG M, CAI L; UDEANI G.; SLOWING K.V, THOMAS C.F; BEECHER C.W; FONG H.H.S, FARNSWORTH N.R, MOON M. RC, PEZZUTO, J.M.; **Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes**. Science Magazine, 1996, p. 218-220.<Disponível em: <http://www.sciencemag.org/content/275/5297/218.short>>. Acesso em: 05 de junho 2014.

LEE, C. W.; YEN F.L.; HUANG, H.W.; W T.H.;KO, H.H; TZENG, W.S.; LIN, C.C. **Resveratrol Nanoparticle System Improves Dissolution Properties and Enhances the Hepatoprotective Effect of Resveratrol through Antioxidant and Anti-Inflammatory Pathways**, J. Agric. Food Chem, Taiwan 5 de abril de 2012. <Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22480310>>. Acesso em: 06 de junho de 2014.

LIU C.; WANG, L.; WANG J.; WU, B.; LIU W.; FAN, P.; LIANG Z.; LI, S. **Resveratrols in Vitis berry skins and leaves: Their extraction and analysis by HPLC**, Journal food chemistry, China, 2012.

LOUREIRO, A. P. M; MEDEIROS, M.H.G. **Formação de Adutos Exocíclicos com Bases de Dna: Implicações em Mutagênese e Carcinogênese**. Quim. Nova, vol. 25, nº. 5, p 777-793, 2002.

MA, T. H.; Xu, Z.; Xu, C; MCCONNEL, H.; RABAGO, E. V.; ARREOLA, G.A.; Zhang, H. **The improved Allium/Vicia root tip micronucleous assay for clastogenicity of enviromental pollutants**. Mutation Research, abril de 1995.

MARQUES L. G. **Liofilização de frutas tropicais**, São Carlos, 2008, 255 f. Dissertação (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos.< Disponível em: [http://www.bdt.d.ufscar.br/htdocs/tedeSimplificado/tde\\_arquivos/10/TDE-2009-10-23T085314Z-2508/Publico/2148.pdf](http://www.bdt.d.ufscar.br/htdocs/tedeSimplificado/tde_arquivos/10/TDE-2009-10-23T085314Z-2508/Publico/2148.pdf)>. Acesso em: 05 de junho de 2015.

MAZZEO D. E.; LEVY C. E.; DE ANGELIS D. F.; MARIN-MORALES M. A. **BTEX biodegradation by bacteria from effluents of petroleum refinery**. Sci Total Environ, 15 de setembro de 2010.

MELO, G. W, BRUNETTO, G., SCANAGATTA V.; BASSO. A. **Modos de distribuição de composto orgânico em viníferas**. Bento Gonçalves, RS: Embrapa Uva e Vinho, 2010. 8 p. (Embrapa Uva e Vinho. Instrução Técnica, 104).<Disponível em: <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/comunicado/cot104.pdf>>. Acesso em: 20 de maio de 2014.

MELO, G.W.B.; BRUNETTO, G. ; BASSO A.; HEINZEN J. **Resposta Das Videiras A Diferentes Modos De Distribuição De Composto Orgânico No Solo**, Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal – São Paulo, Junho 2012. Disponível em< <http://www.scielo.br/pdf/rbf/v34n2/23.pdf> >. Acesso em: 20 maio de 2013.

MELO, P. S. **Composição química e atividade biológica de resíduos agroindustriais**, Piracicaba, 2010, 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Universidade de São Paulo.< Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11141/tde-21102010-161908/pt-br.php>>. Acesso em: 05 de junho de 2014.

MENDES, J.B.E.; Riekes, M. K.; OLIVEIRA V. M.; MICHEL, M.D.; STULZER, H.K.; KHALIL, N.M.; ZAWADZKI, S.F.; MAINARDES, R. M.; FARAGO, P.V.; **PHBV/PCL Microparticles for Controlled Release of Resveratrol: Physicochemical Characterization, Antioxidant Potential, and Effect on Hemolysis of Human Erythrocytes**. The Scientific World Journal, Vol. 2012, pp. 11-13, 2012.  
METTA, I.K.; AYROSA, A.M.I.B.; PALETTA, F.C. O papel da liofilização na conservação de alimentos pelo controle da umidade. 2012. Disponível em:< <http://proceedings.copec.org.br/index.php/shewc/article/view/287#.VkaJHnarS00>>. Acesso em: 20 out 2015.

MIWA, M. **Quem tem medo da acidez?** Disponível em< [http://revistaadega.uol.com.br/artigo/quem-tem-medo-da-acidez\\_691.html](http://revistaadega.uol.com.br/artigo/quem-tem-medo-da-acidez_691.html) >Acesso em: 14 de Julho de 2009.

MORAES, V., LOCATELLI C., **Vinho: uma revisão sobre a composição química e benefícios à saúde**, Revista Evidência Interdisciplinar, Joaçaba, 2010, p 57-68. Disponível em  
<[http://editora.unoesc.edu.br/index.php/evidencia/article/view/1159/pdf\\_255](http://editora.unoesc.edu.br/index.php/evidencia/article/view/1159/pdf_255)[http://editora.unoesc.edu.br/index.php/evidencia/article/view/1159/pdf\\_255](http://editora.unoesc.edu.br/index.php/evidencia/article/view/1159/pdf_255)>. Acesso em: 03 dezembro 2013.

MORENO, C.S. **Estudo do efeito radioprotetor do resveratrol**, 2009 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências na área de Tecnologia Nuclear), São Paulo. Disponível em: < [file:///C:/Users/Silvia/Downloads/CarolinaDosSantosMoreno%20\(3\).pdf](file:///C:/Users/Silvia/Downloads/CarolinaDosSantosMoreno%20(3).pdf) > Acesso em: 20 de março de 2015.

MORGANO, M. A.; FARIA, C. G.; FERRÃO, M. F. *et al.* **Determination of protein in raw coffee for NIR spectroscopy and regression PLS.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.25, n.1, p.25-31, 2005.

MOVASAGHI, Z.; REHMAN, S.; REHMAN, I. **Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues**, Revista Applied Spectroscopy, London, 2008, p 134-179. Disponível em: < <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/05704920701829043> > Acesso em: 03 de abril de 2015.

ODIN, A. P. **Vitamins as antimutagens: advantages and some possible mechanisms of antimutagenic action.** Mutation Research, v.386, pp.39-67, 1997.

OLIVEIRA E A B. **Avaliação de Método Alternativo para Extração e Fracionamento de Substâncias Húmicas em Fertilizantes Orgânicos**, 2011 48 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical,) – Instituto Agrônomo de Campinas, 2011. Disponível em: < <http://www.iac.sp.gov.br/areadoinstitutoposgraduacao/dissertacoes/pb1213909%20ELIEZER%20AUGUSTO%20BAETA%20DE%20OLIVEIRA.pdf> >. Acesso em: 05 de novembro de 2014.

ORLANDO T.G.S.; JUNIOR M.J.P.; SANTOS, A.O.; HERNANDES J.L. **Comportamento das cultivares Cabernet Sauvignon e Syrah em diferentes porta enxertos.** Ciências agro técnicas, Lavras, Minas Gerais, maio/junho 2008. <Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cagro/v32n3/a07v32n3.pdf> >. Acesso em 06 de junho de 2014.

PERIN, E.C.; SCHOTT I.B. **Utilização de Farinha Extraída de Resíduos de Uva na Elaboração de Biscoito Tipo Cookie.** 2011, f.60. Trabalho de Conclusão de Curso de graduação Superior de Tecnologia em Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR. Disponível em: < [http://repositorio.roca.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/296/1/FB\\_COALM\\_2011\\_2\\_06.pdf](http://repositorio.roca.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/296/1/FB_COALM_2011_2_06.pdf) > Acesso em 27 de maio de 2014.

PIRES, A.P.M. **Composição química e atividade antioxidante de folhas de diferentes castas de videira.** 2010, 64 f. Dissertação (Mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar) Escola Superior Agrária de Bragança. Bragança. Disponível em: < <https://bibliotecadigital.ipb.pt/bitstream/10198/4872/1/Versao%20Final.pdf> >. Acesso em: 20 de maio de 2014.

POLLONIO, M A. R. **Alimentos funcionais: as recentes tendências e os aspectos de segurança envolvidos no consumo**, Revista Higiene Alimentar, São Paulo, v.14, p. 26-31, 2000 <Disponível em <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=265357&indexSearch=ID> >. Acesso em: 05 de novembro de 2014.

PÓVOA H.F. **Radicais livres em Patologia Humana.** Rio de Janeiro: Imago, 1995, p 211-246.

PROGETTI, C.B.; ARIMA C. H.; ZANONA R.C. **Evolução dos relatórios de sustentabilidade do Bradesco.** In VIII WORKSHOP DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DO CENTRO PAULA SOUZA, 2013, São Paulo. Disponível em: < <http://www.centropaulasouza.sp.gov.br/pos-graduacao/workshop-de-pos-graduacao-e-> >

pesquisa/008-workshop-2013/trabalhos/gestao\_ambiental\_e\_ocupacional\_para\_desenvolvimento\_sustentavel/121312\_334\_345\_FINAL.pdf> Acesso em 30 de julho de 2014.

PROTAS, J. F.S; CAMARGO, U.A.; MELO, L.M.R. **A vitivinicultura brasileira: realidade e perspectivas. Bento Gonçalves, RS:** Embrapa uva e vinho, 2002. 15 p. (Embrapa Uva e Vinho). Disponível em < <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/vitivinicultura/>>. Acesso em: 09 de maio de 2014.

PROTAS, J.F.S. **Uvas Americanas e Híbridas para Processamento em Clima Temperado. Report of the World Commission on Environment and Development: Our Common Future.** 1987. Disponível em:< <http://www.un.org/documents/ga/res/42/ares42-187.htm>>. Acesso em: 20 de maio de 2014.

RIGON, R.B. **Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas lipídicas sólidas para administração cutânea de trans-resveratrol.** 2013 156 f. Dissertação (Mestrado em Ciência da Saúde) - Farmácia, Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2008. Disponível em< <http://www.bv.fapesp.br/pt/bolsas/134570/desenvolvimento-e-caracterizacao-de-nanoparticulas-lipidicas-solidas-para-administracao-cutanea-de-t/>>. Acesso em : 02 de novembro de 2014.

RIZZON, L.A., **Sistema de Produção de Grapa**, Sistemas de Produção, Bento Gonçalves, RS: Embrapa uva e vinho, 1 p 2006. <Disponível em: <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/sprod/Grapa/introducao.htm> >. Acesso em: 04 de maio de 2014.

RIZZON, L.A.; MENEGUZZO, J. **Sistema de Produção de Grapa**, Destilação do bagaço para elaboração da grapa, Bento Gonçalves, RS: Embrapa uva e vinho, 1 p 2006. <Disponível em: <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/sprod/Grapa/destilacao.htm> >. Acesso em: 20 de abril de 2014.

RIZZON, L.A.; SGANGERLA, V.M.A. **Ácidos tartárico e málico no mosto de uva em Bento Gonçalves-RS.** Ciência Rural, Santa Maria, v.37, n.3, p.911-914, 2007. Disponível em:< [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782007000300053](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782007000300053)> Acesso em 22 de novembro de 2014.

ROBERTO, M.M. **Avaliação do Potencial Antimutagênico de Extrato Etanólico Própolis Verde e de Baccharis Dracunculifolia (Asteraceae), por Meio de Sistema-Teste de *Allium Cepa* e Células de Mamíferos (Htc).** 2009 116f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2009. Disponível em:< <http://repositorio.unesp.br/handle/11449/87737>> Acesso em 08 de setembro de 2015.

ROCKENBACH, I. I. **Compostos fenólicos, ácidos graxos e capacidade antioxidante do bagaço da vinificação de uvas tintas (*Vitis vinifera* L. e *Vitis labrusca* L.).** 2008 112 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, 2008. Disponível em< <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/91153/254768.pdf?sequence=1> >. Acesso em: 20 maio de 2014.



SALES, N. F. F.; CRUZ A. P. G.; CABRAL L. M. C.; TORRES, A. G. **Capacidade Antioxidante de Extratos Hidroalcoólicos do Bagaço De Uva Tinta**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUIMICA, 2012, BUZIOS RJ.

SAMPAIO, S.A.P.; RIVITTI, E.A. **Dermatologia**. 2<sup>a</sup> ed. Artes Médicas: São Paulo, 2001.

SANHUEZA, R. M. V.; SÔNEGO, O. R. **Descrição e recomendações de manejo da fusariose da videira (*Fusarium oxysporum* f. *Sp. Herbemonthis*)**. Bento Gonçalves, 1993. 3 p. Embrapa Uva e Vinho, Comunicado Técnico, 12. <Disponível em: <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/comunicado/cot012.pdf>>. Acesso em: 20 de maio de 2014.

SATO A.F. *et al.* Caracterização fenólica das uvas Alicante e *Syrah* cultivadas em safra fora de época. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal – São Paulo, março 2012.

SAUTTER, C. K.; DENARDIN, S. O.; ALVES, A. O.; MALLMANN, C. A.; PENNA, N.G.; HECKTHEUER, L. H. **Determinação de resveratrol em suco de uva no Brasil**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 25, n.3, p. 437-442, jul./set., 2005. Disponível em:<<http://www.scielo.br/pdf/cta/v25n3/27008.pdf>>. Acesso em: 20 de maio de 2014.

SEFERIN, M.; SOUTO, A. A.; CARNEIRO, M. C.; SENNA, M.J.H.; CONZ, A.; GOBBI, K. **Determinação de trans-resveratrol em vinhos gaúchos por HPLC** In: Salão de iniciação Científica, 2000, Porto Alegre, RS. Disponível em:<<http://www.s bq.org.br/ranteriores/23/resumos/0928/index.html>>. Acesso em: 20 de outubro de 2014.

SHIMA, N.N.S. Hashim; LACHLAN J. S.; REINHARD I. B.; YUANZHONG Y.B.1 D.; HEARN M.T.W. Hearn; **Rapid solid-phase extraction and analysis of resveratrol and other polyphenols in red wine**, Journal of Chromatography A, Australia, 28 June 2013.

SHUKLA Y.; SINGH R. **Resveratrol and cellular mechanisms of cancer prevention**. Annals of The New York Academy Of Sciences, vol. 1215, Lucknow, India, p. 1-8, 2011 <Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1749-6632.2010.05870.x/full>>. Acesso em: 31 de maio de 2014

SILVA J, ERDTMANN B, PEG, J.A. **Genética toxicológica**. 1 ed. Porto Alegre:1 Ed. Alcance, 2003.

SILVA P.D. Determinação de compostos fenólicos por HPLC. 2012 108 f. Dissertação (Mestrado em Química Industrial)-Universidade da Beira Interior, Covilhã, 2012. Disponível em< <https://ubibliorum.ubi.pt/bitstream/10400.6/2766/1/Disserta%C3%A7%C3%A3o.pdf>>. Acesso em: 25 novembro de 2015.

SINDICATO DAS INDÚSTRIAS DE JUNDIAI, Jundiai, SP. **Dados estatísticos de produção de vinho e engarrafamento**, 23/04/2014 10:20. Informações fornecidas por e-mail.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5.ed. Porto Alegre: Editora Bookman, 836 p., 2002.

SOARES, M. WELTER L.; KUSKOSKI, E.M.; GONZAGA, L.; FETT R. **Compostos fenólicos e atividade antioxidante da casca de uvas niágara e Isabel**. Revista Brasileira de

Fruticultura, Jaboticabal – São Paulo, março 2008. Disponível em< <http://www.scielo.br/pdf/rbf/v30n1/13.pdf>>. Acesso em: 20 maio de 2013.

SOUZA, F.G. **Atividade Antimutagênica e Citotóxica da  $\beta$ -glicana de *Agaricus brasiliensis* dependente da MAPK p 38**. 2007, 72f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007. Disponível em:< <http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/13590>> Acesso em 08 de setembro de 2015.

SPIGNO, G., PIZZORNO, T., DE FAVERI, D.M. **Cellulose and hemicelluloses recovery from grape stalks**. Bioresource Technology. V 99. Julho de 2008.

TERRONI, H.C.; JESUS M.; MARTUZO, L.T.; VENTURA L.V.; SANTOS R.F. BEBEDETTI, P.C.D. **Liofilização**. UNILAGO, PP. 271-284, 2014.

THERON, M. M.; LUES, J. F. **Organic Acids and Food Preservation**. 1 Edição. ed. Boca Raton: CRC Press, v. I, 2009. 318 p.

TORRES, C.; MAROTO, M.C.D.;GUTIÉRREZ I.H.; COELLO, M.S.P. **Effect of freeze-drying and oven-drying on volatiles and phenolics composition of grape skin**, Journal Analytica Chimica Acta,4 de agosto de 2009.

TORRES, J.L.; VARELA, B.; GARCIA, M.T.; CARILLA, J.; MATITO, C.; CENTELLES, J.J.; CASCANTE, M.; SORT, X.; BOBET, R. **Valorization of grape (*Vitis vinifera*) byproducts**, Journal Agriculture Food Chemistry, 18 de dezembro de 2002.

UVIBRA- UNIÃO BRASILEIRA DE VITIVINICULTURA, **Dados estatísticos**, 2015 Disponível em:< [http://www.uvibra.com.br/pdf/comercializacao2010a2015\\_set.pdf](http://www.uvibra.com.br/pdf/comercializacao2010a2015_set.pdf)> Acesso em 25 de novembro de 2015.

VACCARI, N.S.F.; HEIDMANN, M.C.; SOCCOL, G.M.E. **Compostos fenólicos em vinhos e seus efeitos antioxidantes na prevenção de doenças**. Revista de Ciências Agroveterinárias, Lages, v.8, n.1, p. 71-83, 2009 <Disponível em<[http://rca.cav.udesc.br/rca\\_2009\\_1/Vaccari.pdf](http://rca.cav.udesc.br/rca_2009_1/Vaccari.pdf)>. Acesso em: 20 de maio de 2014.

VARANDA, E.A. **Atividade mutagênica de plantas medicinais**. Rev. Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada, vol. 27, nº 1, p 1-7,2006

VARELLA, S.D.; POZETTI, G.L.; VILEGAS, W.; VARANDA, E.A. **Mutagenic activity of sweepings and pigments of a household-was factory assayed with *Salmonella typhimurium***. Food and Chemical Toxicol., vol. 42, p. 2029-2035, 2004.

VENTURA-CAMARGO, B.C.; MALTEMPI, P.P.P.; MARIN-MORALES, A. **The use of the Cytogenetic to Identify Mechanisms of Action of an Azo Dye in *Allium Cepa* Meristematic Cells**.environmental & Analytical Toxicology, 29 de novembro de 2011.

VERDI, A.R.; OTANI, M.N.; MAIA, M.L.; FREDO, C.E.; HERNANDES, J.L. **Caracterização Sócio-Econômica e Perfil Produtivo da Produção de Uva e Vinho Artesanal no Município de Jundiaí, Estado de São Paulo**. Informações Econômicas, São Paulo, maio de 2010. Disponível em:< <ftp://ftp.sp.gov.br/ftpiea/publicacoes/IE/2010/tec3-0510.pdf>>. Acesso em: 21 de outubro de 2014.

VIT, F.F. **Análise bromatológica de farinha de engaço e semente de uva orgânica.** XVII Encontro de jovens Pesquisadores da UCS Set 2009-Instituto de Biotecnologia UCS, Caxias do Sul. <Disponível em [www.google.com.br/search?q=Análise+bromatológica+de+farinha+de+engaço+e+semente+d+e+uva+orgânica.&oq=Análise+bromatológica+de+farinha+de+engaço+e+semente+de+uva+o+rgânica.&aqs=chrome..69i57.276988j0j7&sourceid=chrome&es\\_sm=122&ie=UTF-8](http://www.google.com.br/search?q=Análise+bromatológica+de+farinha+de+engaço+e+semente+d+e+uva+orgânica.&oq=Análise+bromatológica+de+farinha+de+engaço+e+semente+de+uva+o+rgânica.&aqs=chrome..69i57.276988j0j7&sourceid=chrome&es_sm=122&ie=UTF-8)>. Acesso em: 21 de setembro de 2014.

WANG, Z.; HUANG, Y.; ZOU, J.; CAO K.; , XU, Y.; WU, J.M. **Effects of red wine and wine polyphenol resveratrol on platelet aggregation in vivo and in vitro.** Int. J. Mol. Med. v 9, janeiro de 2002.

WANG, Z.; HUANG, Y.; ZOU, J.; CAO K.; , XU, Y.; WU, J.M. **Effects of red wine and wine polyphenol resveratrol on platelet aggregation *in vivo and in vitro*.** Int. J. Mol. Med. v 9, janeiro de 2002.

WATERS, M. D., BRADY, A. L.; STACK, H. F.; BROCKMAN, H. E. **Antimutagenicity profiles for some model compounds.** Mutation Research, v.238, pp.57-85, 1990.