

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE ENGENHARIA QUÍMICA
CURSO DE ENGENHARIA QUÍMICA**

AMANDA MICHELLS ROCHA

**PRODUÇÃO DE EXTRATOS DOS RESÍDUOS DE INDÚSTRIA VINÍCOLA E SUA
AVALIAÇÃO ANTIOXIDANTE E CITOTÓXICA**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**FRANCISCO BELTRÃO
2018**

AMANDA MICHELLS ROCHA

**PRODUÇÃO DE EXTRATOS DOS RESÍDUOS DE INDÚSTRIA VINÍCOLA E SUA
AVALIAÇÃO ANTIOXIDANTE E CITOTÓXICA**

Trabalho de Conclusão de Curso para obtenção do grau de bacharelado em Engenharia Química pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Francisco Beltrão.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elisângela Düsman.

Coorientadores: Prof^a. Dr^a. Irede Angela Lucini Dalmolin e Prof^a. Dr^a. Ana Paula Romio.

**FRANCISCO BELTRÃO
2018**

FOLHA DE APROVAÇÃO

AMANDA MICHELLS ROCHA

PRODUÇÃO DE EXTRATOS DOS RESÍDUOS DE INDÚSTRIA VINÍCOLA E SUA AVALIAÇÃO ANTIOXIDANTE E CITOTÓXICA

Trabalho de Conclusão de Curso para obtenção do grau em Engenharia Química pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Francisco Beltrão.

Data de aprovação: 23 de novembro de 2018.

Elisângela Düsman, Professora Doutora

Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Francisco Beltrão

Irede Angela Lucini Dalmolin, Professora Doutora

Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Francisco Beltrão

Luciano Lucchetta, Professor Doutor

Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Francisco Beltrão

A folha de aprovação assinada encontra-se na coordenação do curso ou programa.

“Dedico este trabalho aos meus pais, por sempre sonharem os meus sonhos e me ajudarem a cada passo dessa caminhada. ”

AGRADECIMENTOS

Diante dessa etapa de conclusão, gostaria de agradecer primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, o autor da minha história e meu guia mostrando a direção em meio ao caminho. Sou grata por ter me concedido a possibilidade de realizar esse sonho e por ter planos muito maiores e melhores para mim.

À minha família que, mesmo estando fisicamente distante, mas com amor incondicional, não mediram esforços para que eu chegasse até essa etapa de minha vida. À minha mãe Maria Lucia, que me deu apoio e incentivo principalmente nos momentos difíceis de desânimo e cansaço. Ao meu pai Gilson Luis, que me fortaleceu em momentos de dificuldade, mostrando que sempre há soluções para os problemas.

À minha orientadora Prof. Dr^a. Elisangela Düsman e coorientadora Prof. Dr^a. Irede Dalmolin pela paciência, profissionalismo, disponibilidade, sabedoria, conhecimento e amizade envolvidos nesse processo. Gratidão a vocês que idealizaram, incentivaram e me auxiliaram a executar esse projeto.

À minha coorientadora Prof. Dr^a. Ana Paula Romio e os professores Dr^o. Luciano Luchetta e a Dr^a. Carolina Panis que contribuíram com sua atenção e ensinamentos.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná, pelos recursos financeiros concedidos em todo o período da graduação.

À CAPA do Verê e a indústria vinícola, pela disponibilização da matéria-prima estudada.

Às pessoas bem próximas, outras mais distantes, que fizeram parte dessa trajetória, me acompanhando a cada dia e me transformando em uma pessoa melhor. Meu muito obrigada a todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte da minha formação e acreditaram que esse sonho seria possível.

“ Menor que meu sonho não posso ser”

Lindolf Bell

RESUMO

O câncer é um dos maiores problemas de saúde mundial e devido ao aumento de tumores e os efeitos secundários dos medicamentos tradicionais, torna-se necessário reconhecer novas substâncias antitumorais, especialmente as naturais. A uva (*Vitis labrusca* L.) possui vários compostos que são benéficos a saúde humana e é consumida de diferentes formas, em especial na forma de sucos integrais. Assim, considerando a grande geração de resíduos de uva durante a produção de seus sucos e, que este bagaço ainda possui muitos compostos bioativos presentes na fruta, buscou-se obter extratos do bagaço de uva orgânica, para aplicação em indústria farmacêutica, visando a produção de medicamento com atividade antitumoral. Os extratos foram produzidos utilizando os solventes etanol e acetato de etila, pelo método de imersão a 35°C, sendo o rendimento da extração, utilizando um S/F (solvente/massa) = 75, de 9% (etanol) e 5% (acetato de etila). O potencial antioxidante dos extratos foi realizado pelo procedimento utilizando Trolox®-DPPH, e mostrou uma concentração de 196,5 µM TEAC/100g de extrato etanólico e 178,8 µM TEAC/100g de extrato com o acetato de etila. Os efeitos citotóxicos dos extratos foram avaliados pelo teste do MTT, com a cultura de células de hepatoma de *Rattus norvegicus* (HTC), expostas a 24, 48 e 72 horas às concentrações de 50, 75, 100, 150, 200, 250, 500, 750, 1000 e 2500 µg do extrato/mL de meio de cultura. As concentrações testadas no tempo de 24 horas, para ambos dos extratos, não apresentaram citotoxicidade às células tumorais. No tempo de 48 horas, as concentrações de ambos os extratos proporcionaram um aumento da viabilidade celular, ou seja, causaram a proliferação das células HTC. Já no tempo de 72 horas, as concentrações de 50, 75 e 100 µg/mL do extrato obtido com o solvente acetato de etila e todas as concentrações testadas com o extrato etanólico foram citotóxicas. De forma geral, o extrato etanólico apresentou maior quantidade de compostos antioxidantes e melhor atividade antitumoral. Assim, os dados do presente estudo propõem um aproveitamento dos resíduos da indústria vinícola na indústria farmacêutica, para a produção de medicamentos antitumorais.

Palavras-chave: Bagaço de uva. Extração. Antioxidantes. MTT. Citotoxicidade. Antitumoral.

ABSTRACT

Cancer is one of the biggest health problems worldwide and due to the increase of tumors and the side effects of traditional medicines, it is necessary to recognize new antitumor substances, especially the natural ones. The grape (*Vitis labrusca* L.) has several compounds that are beneficial to human health and is consumed in different ways, especially in the form of whole juices. Thus, considering the great generation of grape residues during the production of its juices, and that this bagasse still has many bioactive compounds present in the fruit, it was sought to obtain extracts of the organic grape marc for application in the pharmaceutical industry, aiming the production of medicament with antitumor activity. The extracts were produced using the solvents ethanol and ethyl acetate by the immersion method at 35 ° C, the extraction yield using a S / F (solvent / mass) = 75, 9% (ethanol) and 5% (ethyl acetate). The antioxidant potential of the extracts was performed using Trolox®-DPPH and showed a concentration of 196.5 µM TEAC / 100g ethanolic extract and 178.8 µM TEAC / 100g extract with ethyl acetate. The cytotoxic effects of the extracts were evaluated by the MTT test with culture of *rattus norvegicus* (HTC) hepatoma cells, exposed at 24, 48 and 72 hours at concentrations of 50, 75, 100, 150, 200, 250, 500, 750, 1000 and 2500 µg of the extract / ml culture medium. The concentrations tested at the time of 24 hours, for both extracts, did not present cytotoxicity to the tumor cells. At the 48 hour time, the concentrations of both extracts provided an increase in cell viability, i.e., caused the proliferation of the HTC cells. At the time of 72 hours, the concentrations of 50, 75 and 100 µg / mL of the extract obtained with the ethyl acetate solvent and all the concentrations tested with the ethanolic extract were cytotoxic. In general, the ethanolic extract presented higher amount of antioxidant compounds and better antitumor activity. Thus, the data of the present study propose a use of residues of the wine industry in the pharmaceutical industry, for the production of antitumor drugs.

Key words: Grape bagasse. Extraction. Antioxidants. MTT. Cytotoxicity. Antitumoral.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	12
2.1 OBJETIVO GERAL	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	13
3.1 RADICAIS LIVRES E ANTIOXIDANTES	13
3.2 UVA, VINIFICAÇÃO E BAGAÇO	14
3.3 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS DE INTERESSE	19
3.3.1 Seleção dos Solventes	20
3.3.2 Método Soxhlet	22
3.3.3 Método de Imersão	23
3.4 CÂNCER E ATIVIDADES CITOTÓXICAS/ANTITUMORAIS EM CULTURA DE CÉLULAS	24
4 METODOLOGIA	27
4.1 OBTENÇÃO E PRÉ-TRATAMENTO DA MATÉRIA-PRIMA	27
4.2 DETERMINAÇÃO DA UMIDADE DO BAGAÇO	27
4.3 DIÂMETRO DAS PARTÍCULAS DO BAGAÇO	28
4.4 EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS DE INTERESSE	29
4.5 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS	29
4.6 TESTE DE ATIVIDADE CITOTOXICA/ANTITUMORAL	30
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	32
5.1 UMIDADE E DIÂMETRO DAS PARTÍCULAS	32
5.2 EXTRAÇÃO PELO MÉTODO DE IMERSÃO E SOXHLET	33
5.3 POTENCIAL ANTIOXIDANTE	35
5.4 CITOTOXICIDADE/ATIVIDADE ANTITUMORAL	37
6 CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS	45

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um problema envolvendo a saúde dos seres vivos, sendo que ocorre em todos os tipos de países, desenvolvidos ou em desenvolvimento. É uma doença que causa grande medo na sociedade, visto que possui uma alta taxa de mortalidade e sofrimento. De acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2018), em 2016, cerca de mais de oito milhões de pessoas morrem por conta dessa doença, representando 11% da população mundial.

Durante a década de 60, o Nacional Cancer Institute (EUA) realizou uma grande pesquisa associada a extratos de plantas que possuíam atividade antitumoral (GOMES, 2008). Desde então, há um amplo interesse em compostos extraídos de fontes naturais, que possam ser utilizados como fármacos antitumorais.

Frutas, legumes e várias plantas em geral possuem substâncias que são benéficas à saúde, pois melhoram o sistema imunológico, cardiovascular, e especialmente, apresentam propriedades citoprotetoras, antimutagênicas e anticarcinogênicas (DÜSMAN, 2009).

De acordo com Oliveira (2010), as uvas possuem uma grande produção e consumo, além de apresentar uma quantidade significativa de compostos fenólicos e atividades antioxidantes, sendo que esses compostos podem ser utilizados no tratamento de inúmeras doenças.

As uvas são comumente consumidas *in natura* ou seu consumo está associado a produção de diversos alimentos ou bebidas como o vinho, suco da uva, geleias, dentre outros (GUERRA, 2003). Durante o processamento das uvas, principalmente na produção de sucos e vinhos, gera-se grande quantidade de resíduos sólidos, chamado de bagaço, formado principalmente de cascas e sementes (OLIVEIRA, 2010).

No Brasil, esse resíduo é simplesmente utilizado para fertilizantes do solo, alimentação animal, incineração e para a obtenção do destilado graspa (DALMOLIN, 2013). Porém, da mesma forma que existem compostos benéficos na polpa da fruta, muitos antioxidantes e outros compostos ainda permanecem no bagaço. Dessa forma, a aplicação desses resíduos para a obtenção de compostos bioativos pode representar um ganho econômico e científico (OLIVEIRA, 2010).

Sabe-se que é possível obter extratos com a presença de vitaminas e compostos antioxidantes de interesse a partir das sementes de uvas, podendo aplicá-

los na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica (DALMOLIN, 2013). Porém, pouco foi estudado sobre os compostos obtidos através de extratos a partir do bagaço de uva.

O método convencional de obtenção de extratos e óleos consiste na combinação da prensagem da matriz sólida com a extração utilizando solvente orgânico. O uso de solventes permite a extração de maior quantidade de componentes não glicéricos, que não são retirados pela ação mecânica (SHAHIDI, 2005).

O solvente mais utilizado atualmente é o hexano, pois apresenta um excelente poder de solvência, principalmente na extração de sementes oleaginosas, além de conter uma separação facilitada de óleos ou gorduras. Entretanto, apesar de o hexano ser o solvente mais empregado, esse é suspeito de deixar resíduos nocivos à saúde, pois é obtido por destilação de frações de hidrocarbonetos de petróleo, podendo conter hidrocarbonetos aromáticos e polinucleares, os quais são carcinogênicos (DALMOLIN, 2013).

Dessa forma, busca-se estudar a utilização de outros solventes no processo de extração, realizando assim, a substituição do hexano. O etanol e o acetato de etila são considerados solventes que se enquadram na química verde, ou seja, são produtos advindos de processos sustentáveis. Além disso, ambos possuem um bom poder de solvência e não geram resíduos tóxicos a saúde humana.

Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos antioxidantes e citotóxicos/antitumorais, frente a cultura de hepatoma de rato, de diferentes extratos obtidos a partir do bagaço de uvas orgânicas, resíduo de uma indústria de sucos de uva da região Sudoeste do estado do Paraná.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Obter extratos do resíduo sólido gerado por uma indústria vinícola e avaliar suas ações antioxidantes e citotóxicas, frente as células tumorais de fígado de rato.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste trabalho são:

- a) Obter, por meio do método de extração por imersão, extratos dos resíduos sólidos gerados em indústrias vinícolas;
- b) Avaliar a eficiência da extração através dos rendimentos e comparações com o método oficial;
- c) Caracterizar físico-quimicamente os extratos obtidos;
- d) Recuperar o solvente utilizado na extração;
- e) Avaliar os efeitos citotóxicos/antitumorais de diferentes concentrações dos extratos em células tumorais hepáticas de rato;
- f) Comparar a atividade citotóxica/antitumoral dos extratos, afim de identificar a melhor forma de utilização dos mesmos;
- g) Propor um aproveitamento dos resíduos sólidos gerados em indústrias vinícolas, através do seu uso na indústria farmacêutica para a produção de medicamentos antitumorais.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 RADICAIS LIVRES E ANTIOXIDANTES

As espécies reativas de oxigênio, que contêm um ou mais elétrons desemparelhados, são consideradas moléculas instáveis e, apresentam dessa forma, uma grande capacidade reativa, podendo reagir com as células ou tecidos do organismo, sendo capazes de gerar lesão celular (ROCK; JACOB; BOWEN, 1996).

O organismo sofre ação frequente de radicais gerados pelo processo respiratório, pelas reações oxidativas que ocorrem em células aeróbias, pelos processos inflamatórios, por alguma disfunção biológica, pelo consumo de determinados alimentos, dentre outros (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). Além disso, esta pode ser aumentada devido à exposição a agentes ambientais, como os resíduos químicos tóxicos, fumaça emitida de forma direta ou indireta dos cigarros, pesticidas, poluentes atmosféricos urbanos, principalmente os resultantes da combustão da gasolina, pelo contato com radiações, no estresse, e por outros fatores. Dessa forma não ocorre o equilíbrio entre a produção de espécies reativas e a remoção destas pelos sistemas de defesa antioxidante, com predomínio dos pró-oxidantes, sendo que esse desequilíbrio é denominado de estresse oxidativo ou desbalanço redox (FERREIRA; ABREU, 2007).

Assim sendo, os radicais livres podem desenvolver reações com substratos biológicos, podendo ocasionar danos às biomoléculas e, por consequência, afetar a saúde humana. Os danos mais graves e preocupantes são aqueles causados ao DNA (ácido desoxirribonucleico) e ao RNA (ácido ribonucleico), que podem resultar em mutações e oncogênese. Quando atuam sobre a membrana celular, a oxidação de lipídios interfere no transporte ativo e passivo através da membrana, ou ocasiona a ruptura desta, levando à morte celular. A oxidação de lipídios no sangue agride as paredes das artérias e veias, facilitando o acúmulo desses lipídios, podendo causar trombose, infarto ou acidente vascular cerebral (SIKORA et al., 2008).

Para combater a ação nociva dos radicais livres, os organismos vivos desenvolveram os sistemas de defesa antioxidantes. Antioxidantes são substâncias que quando presentes no organismo reduzem ou previnem significativamente a oxidação do substrato (FERREIRA; ABREU, 2007).

Os sistemas de defesas antioxidantes do organismo têm como principal função impedir ou diminuir os danos causados às células pela oxidação. Os mecanismos de ação dos antioxidantes são distintos e se classificam como: mecanismos de prevenção, que impedem a formação de radicais livres; mecanismos sequestradores, que impedem o ataque dos radicais livres às células; mecanismos de reparo, que favorecem a remoção de danos da molécula de DNA e a reconstituição das membranas celulares danificadas (PICADA et al., 2003; TELESIL; MACHADO, 2008).

A inclusão de antioxidantes na dieta é de extrema importância, além disso, o consumo de frutas e vegetais auxilia na diminuição do risco do desenvolvimento de doenças associadas ao acúmulo de radicais livres (FERREIRA et al., 2010).

Descobriu-se que muitos antioxidantes, além de neutralizarem os radicais livres, possuíam atividade antitumoral, visto que inibiam a ação do grupo de enzimas (topoisomerase II) que realizam a abertura da dupla fita de DNA, impedindo o processo de replicação e reparo celular, podendo levar a morte da célula (REBELLO, 2005). Além disso, segundo Williams (2004) alguns antioxidantes como os flavonóides podem atuar nas vias de sinalização da proteína quinase, alterando o processo de transcrição e, conseqüentemente, a produção de proteínas necessárias para manter as células tumorais, podendo levá-las a morte. Nota-se que no experimento de Sánchez (2006), os tratamentos com antioxidantes resultaram em alterações metabólicas, restringindo a capacidade de proliferação de células tumorais através de alterações seletivas no ciclo celular, induzindo a ação mitocondrial intrínseca, levando as células tumorais a apoptose. Além disso, os antioxidantes reduziram a produção de ribose e inibiram a glicólise das células tumorais, levando as mesmas a apoptose.

Neste sentido, as uvas são consideradas como uma das maiores fontes de compostos fenólicos e de atividade antioxidante quando comparadas a outras frutas e vegetais (SOUZA et al., 2012), estimulando as pesquisas com relação aos seus efeitos benéficos à saúde, em especial, atividade antitumoral.

3.2 UVA, VINIFICAÇÃO E BAGAÇO

A introdução da videira no Brasil foi realizada pelos colonizadores portugueses em 1532, por Martin Afonso de Souza, na então Capitania de São

Vicente, hoje Estado São Paulo. Em seguida, a viticultura se espalhou para outras regiões do país (PROTAS; CAMARGO; MELO, 2002).

A vitivinicultura é uma atividade economicamente importante no mundo globalizado. No Brasil, é uma atividade que gera emprego, renda e grandes investimentos na área da produção de uvas de mesa e uvas para o processamento, movimentando a economia (EMPRAPA, 2009). Embora tenha começado de maneira tímida e com muitas dificuldades, a vitivinicultura brasileira pertence ao chamado novo mundo vitivinícola, se juntando com países como China, Argentina, Estados Unidos, África do Sul, Austrália e outros. Nas últimas décadas houve um grande aumento dessa produção devido a expansão da área cultivada e da melhoria da tecnologia da produção das uvas e elaboração dos vinhos (VIEIRA; WATANABE; BRUCH, 2012).

De acordo com Mello (2010), aproximadamente metade da produção da uva no país é destinada ao processamento para realização de vinhos, suco de uva e derivados, sendo o restante destinado ao mercado de uva *in natura*.

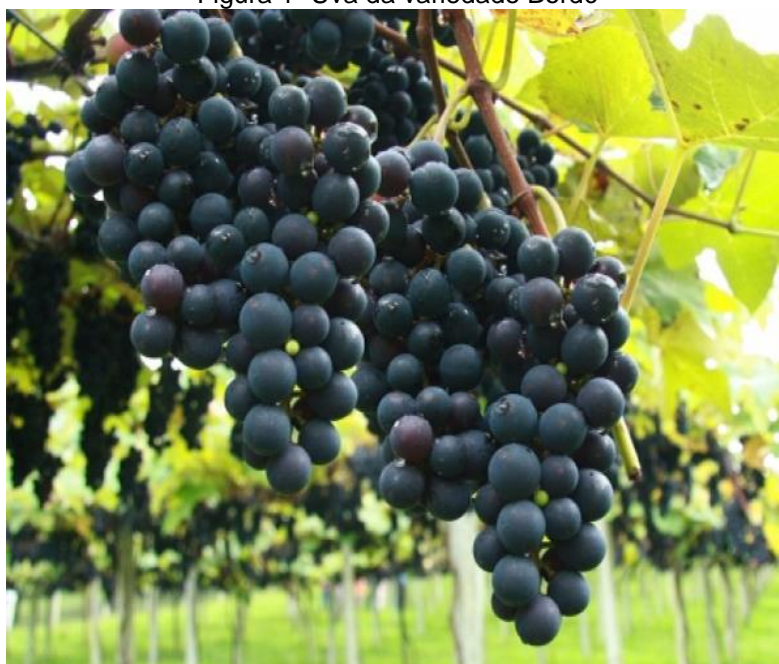
Em geral, os produtos orgânicos são considerados mais seguros e saudáveis do que aqueles produzidos de maneira convencional. As plantas advindas da agricultura orgânica possuem um tempo maior de amadurecimento do que as convencionais e, como os flavonoides são formados durante este período, acredita-se que a concentração de compostos fenólicos seja maior nas plantas de produção orgânica (GRINDER-PEDERSON et al., 2003).

A região Sudoeste do Paraná destaca-se na produção de uva orgânica e derivados, o que comprova a valorização de alimentos produzidos em sistemas que estabeleçam um compromisso com a preservação ambiental, da saúde do produtor e do consumidor e da estrutura de produção, ao invés de alimentos produzidos convencionalmente, onde se aplicam herbicidas e produtos à base de cobre, como a calda bordalesa (ROMBALDI et al., 2004).

A variedade Bordô (Figura 1), originária dos Estados Unidos, é uma das principais uvas *Vitis labrusca* L. produzidas nacionalmente. Na década de 1850, a variedade despertou interesse dos viticultores europeus devido à sua grande resistência a doenças (GRIGOLETTI; SÔNEGO, 1993). No Brasil, foi introduzida no Rio Grande do Sul em 1839, com o nome de Ives ou Folha de Figo, e seu crescimento ocorreu rapidamente devido à sua fácil adaptação agrícola, alta produtividade e rusticidade (RIZZON; MANFROI; MENEGUZZO, 1998).

Uvas Bordô são principalmente destinadas à elaboração de sucos, vinhos, vinagres e geleias, e ao consumo *in natura* (RIZZON; MANFROI; MENEGUZZO, 1998). A variedade é bastante aplicada na atividade agroindustrial, pois possui elevado teor de compostos corantes, permitindo aumentar a intensidade de cor de sucos e vinhos de cultivares com coloração deficiente. As uvas contêm teor de sólidos solúveis entre 13 e 16 °Brix e reduzida acidez total (RIZZON; MENEGUZZO, 2007).

Figura 1- Uva da variedade Bordô



Fonte: Plantar (2018).

Originária também dos Estados Unidos, a variedade Isabel (Figura 2) foi introduzida no Brasil na década de 1830, tornando-se a principal variedade produzida em área de parreirais do país. É a variedade mais cultivada no Rio Grande do Sul e em Santa Catarina, representando 50% do total de uvas produzidas. Na região Sul, é muito bem adaptada às condições climáticas, seus vinhedos atingem de 80 a 100 anos (CAMARGO, 2008).

A variedade também é denominada Americana, Uva Manga e Nacional, (RIZZON; MANFROI; MENEGUZZO, 1998). Suas características incluem cachos pequenos ou médios, baga preta, média, polpa mucilaginosa, desprendendo-se facilmente da película, e sabor de framboesa agradável. Apresenta boa rusticidade e alta fertilidade (CAMARGO, 2008).

Uvas Isabel são destinadas ao consumo *in natura* e empregadas na elaboração de sucos, vinhos de mesa, geleias e doces. Origina sucos e vinhos com

aroma “foxado”, pouco coloridos, mas bastante apreciados por consumidores. O suco Isabel é o principal suco de uva brasileiro para exportação (CAMARGO, 2008). Entre as uvas, essa variedade apresenta baixa acidez e elevado teor de sólidos solúveis na baga, que pode variar entre 16 e 19 °Brix (RIZZON; MENEGUZZO, 2007).

Figura 2- Uva da variedade Isabel



Fonte: Embrapa (2018).

Com o processamento das uvas geram-se vários subprodutos secundários a vinificação, como o bagaço, o engaço e a borra. O bagaço é considerado o principal resíduo da vinificação, por ser o de maior volume quando comparado aos outros resíduos gerados, pela sua riqueza alcoólica e tartárica e pelo interesse econômico de alguns compostos. O bagaço é o produto resultante da prensagem das uvas, composto pelas partes sólidas das uvas (como as sementes, casca e certa quantidade de engaço) e pelo mosto (OLIVEIRA, 2010).

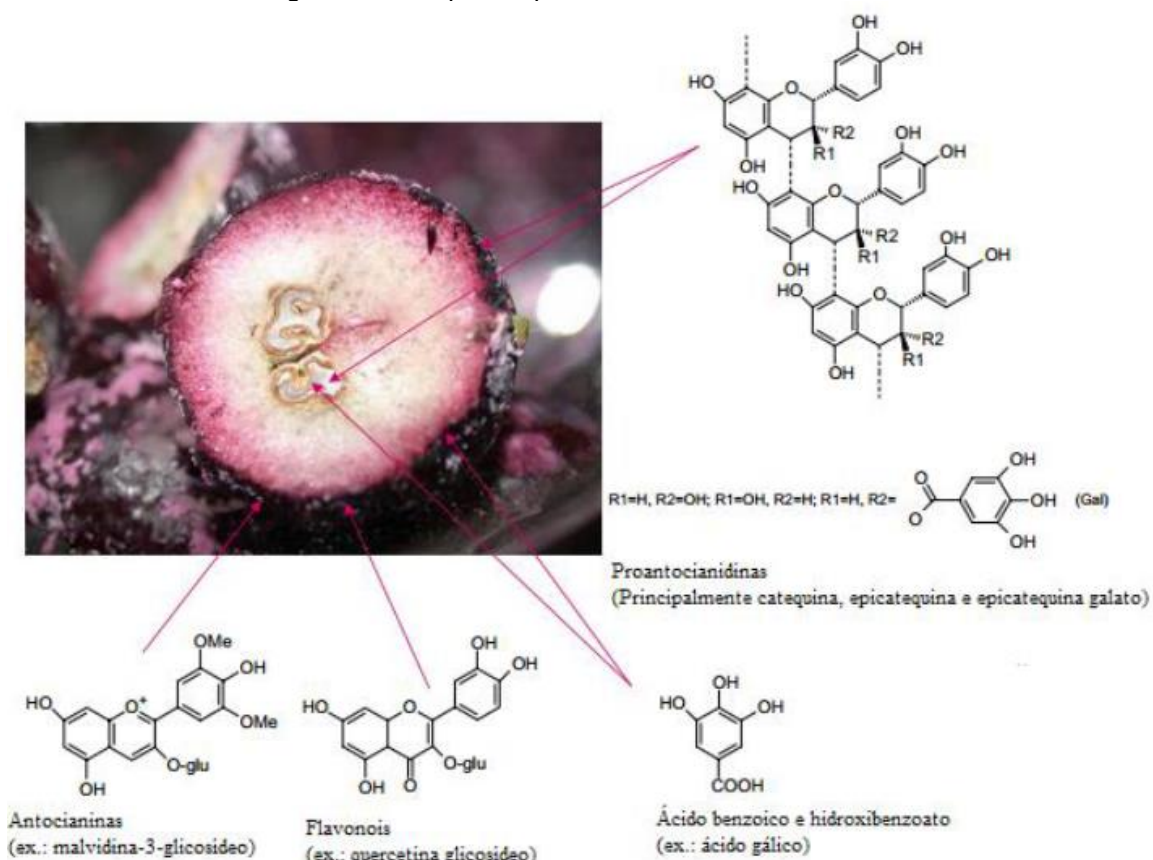
Através de dados industriais, sabe-se que na produção de 100 litros de vinho tinto gera-se 25 kg de resíduo, em que 17 kg constitui o bagaço. No Brasil, uma pequena quantidade de resíduo é utilizada para a produção de destilado de uva (também chamado de graspa), porém a maior parte é desperdiçada ou utilizada para adubação do solo e complemento de ração animal, já que são fontes de fibras e proteínas. Com relação à adubação, o seu uso frequente não é conveniente, pois a biodegradação das sementes de uva é lenta, não convertendo toda a matéria orgânica até a chegada de outra safra. Também há uma desvantagem em relação à alimentação dos animais, pois o bagaço não pode ser oferecido puro, devido a sua

grande quantidade de fibras, então precisa ser triturado e misturado com produtos complementares, tornando inviável seu consumo em grande escala (FREITAS, 2007).

A recuperação de compostos bioativos a partir dos descartes da indústria vinícola poderia representar um avanço para a manutenção do equilíbrio do meio ambiente, pois para as vinícolas, a grande quantidade de resíduo gerado ocasiona problemas de armazenagem, de transformação ou eliminação. Dessa forma, há um interesse crescente em agregar valor aos resíduos da vinificação, visto que são ricos em compostos de interesse da indústria farmacêutica, química e alimentícia (ROCKENBACH et al., 2008).

A uva é uma fonte de diversos compostos fenólicos e seus resíduos podem manter quantidades consideráveis desses compostos como: os flavonoides (antocianinas e flavonóis), os estilbenos (resveratrol), os ácidos fenólicos e uma grande variedade de taninos (Figura 3). A composição química do bagaço da uva é bem variável, dependendo do modo de vinificação, das condições climáticas, dos sistemas de condução da vinha, da variedade da uva e do estado sanitário das uvas no momento da vindima (ROCKENBACH et al., 2008).

Figura 3 – Compostos presentes nos resíduos da uva



Fonte: Pinelo (2006)

A casca da uva é uma fonte de antocianidinas e de antocianinas, que são corantes naturais que apresentam propriedades antioxidantes e antimutagênicas. Entretanto, o engaço, presente em pequena quantidade no bagaço, contém grande quantidade de polifenóis que apresentam um alto potencial de nutrição e aplicação farmacológica (SOUQUET et al., 1996).

De acordo com Moretto e Fett (1998), dependendo da variedade da uva, a semente possui de 14 a 17% de óleo, e este é rico em ácidos graxos insaturados, com um elevado teor de ácido linoleico, conhecido também como Ômega 6 (ácido graxo essencial para o homem que não é capaz de sintetizá-lo e que não está presente nos óleos comumente utilizados, como soja, milho e algodão).

Por ser rica em óleo essencial de alto valor agregado, a semente é o resíduo da uva mais utilizado por indústrias químicas, cosméticas e farmacêuticas (OLIVEIRA, 2010). De qualquer forma, é necessário extrair os compostos bioativos destes materiais.

3.3 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS DE INTERESSE

A extração é uma das operações unitárias mais utilizadas na indústria de alimentos e química, aplicada principalmente para a obtenção de certos componentes de interesse que estão contidos em uma matriz sólida. As substâncias extraídas podem ser aplicadas como aditivos alimentares ou serem usadas para algum efeito específico da saúde humana, como no tratamento de doenças, em especial, os quimioterápicos (PINELO et al., 2005).

Há diferentes métodos para a extração de produtos naturais e essa escolha é muito importante, pois esta influencia diretamente na qualidade e nos compostos obtidos ao final. O processo de extração é definido pelo o que se deseja extrair e se o objetivo é quantitativo ou qualitativo (MOURE et al., 2001).

Sabe-se também que os métodos de extração dependem de fenômenos como a difusão e, dessa forma, a renovação do solvente e a agitação propiciam um maior rendimento e eficácia do processo. Além disso, o rendimento e a composição do extrato também estão associados ao solvente utilizado, visto que a solubilidade das substâncias se dá em função de uma afinidade química existente entre as espécies do sistema e sua polaridade (ROCKENBACH, 2008).

As técnicas mais convencionais de extração com o uso de solventes são a combinação da prensagem da matriz sólida, maceração e com o método do Soxhlet. Essas técnicas são amplamente empregadas nas indústrias químicas, farmacêuticas e alimentícias, além de poder utilizar uma ampla variedade de solventes como metanol, etanol, hexano, clorofórmio, acetato de etila, acetona, dentre outros. Contudo, a principal desvantagem desses processos é que essas técnicas requerem um alto custo energético e podem degradar os compostos termossensíveis, pois utilizam altas temperaturas de extração ou de separação da mistura entre o extrato e o solvente (BISCAIA, 2007).

A recuperação do solvente é uma etapa do processo de extrema importância, pois questões ambientais, econômicas e da própria qualidade do extrato estão relacionadas. Analisando ambientalmente e economicamente, a recuperação do solvente possibilita a utilização do mesmo em outros processos, gerando assim um equilíbrio ambiental e uma redução nos custos; objetivos amplamente buscados pelas indústrias. Por outro lado, analisando a qualidade do extrato gerado, a recuperação do solvente é importante para que não haja resíduo do mesmo no extrato final, principalmente por sua toxicidade, sua capacidade reagente ou até mesmo pela sua interferência no aroma e no extrato obtido (BISCAIA, 2007).

3.3.1 Seleção dos Solventes

Um dos solventes mais utilizados é o n-hexano, pois apresenta excelente poder de solvência para uma grande quantidade de matéria-prima, além do que, a separação entre o extrato e o solvente é facilitada, simplificando o processo de recuperação do solvente e, principalmente, não afetando a qualidade dos produtos extraídos (DALMOLIN, 2013).

Apesar do n-hexano ser o solvente mais empregado, este pode deixar resíduos nocivos à saúde, pois sua obtenção é por destilação de frações de hidrocarbonetos de petróleo, podendo conter hidrocarbonetos aromáticos e polinucleares, ambos carcinogênicos, e podem se concentrar no óleo ou permanecer na torta prensada após a dessolventização.

Desta forma, estudos têm mostrado relativa eficiência de outros solventes para a utilização no processo de extração, ocorrendo então a substituição no n-hexano (DALMOLIM, 2013). Uma alternativa para essa substituição é a utilização de solventes

como o acetato de etila e o etanol, pois são solventes com bom poder de solvência, não geram resíduos tóxicos, são considerados seguros para a saúde humana e possuem fácil recuperação para reutilização.

De acordo com Prado (2003), dentro dos princípios do desenvolvimento sustentável, a química deve manter e melhorar a qualidade de vida, diminuindo sempre os danos causados ao meio ambiente. O objetivo é aprimorar os processos químicos gerando menos resíduos, efluentes tóxicos e gases indesejáveis. Sabe-se que as produções dos solventes acetato de etila e etanol são advindas de fontes renováveis, incluindo esses solventes dentro da química verde.

O acetato de etila é um solvente oxigenado muito utilizado na produção de adesivos à base de poliuretano, tintas à base de nitrocelulose e também como solvente extrator na indústria farmacêutica. Sua crescente aplicação industrial deve-se à substituição de solventes equivalentes, como por exemplo, solventes aromáticos e alguns solventes cetônicos que são mais agressivos ao meio ambiente, em razão da política ambiental dos governos que vêm regulando e controlando as emissões que geram poluição (MELLO JÚNIOR, 2010). O acetato de etila faz parte do grupo funcional dos ésteres (grupo que é considerado praticamente apolar), com um alto poder de solvência, sendo utilizado para extração de compostos apolares, visto que possui uma baixa polaridade.

O etanol é produzido desde os tempos antigos pela fermentação dos açúcares encontrados em produtos vegetais como cereais, beterraba e cana-de-açúcar. Ainda hoje, boa parte do etanol industrial é feita por meio da fermentação, embora também seja feita sinteticamente de fontes como o eteno, derivado do petróleo. O novo conceito de etanol, o bioetanol, corresponde a sua fabricação utilizando como matéria-prima a biomassa lignocelulósica, ou seja, matérias-primas provenientes de sobras e resíduos de produtos naturais como o sabugo e a palha do milho, o bagaço, as pontas e as palhas da cana-de-açúcar (BASTOS, 2007). Além de ser aplicado como combustível, o etanol, que faz parte do grupo funcional dos álcoois, também é muito utilizado como solvente, visto que possui poder de solvência bom e é utilizado para extração de compostos polares, pois possui características polares.

A escolha dos solventes se torna muito importante para determinar quais compostos farão parte do extrato, por isso, escolheu-se realizar a extração do bagaço de uva com dois solventes distintos em polaridade e grupo funcional, sendo esses o

etanol e o acetato de etila, visando avaliar qual solvente extraiu maior quantidade de compostos de interesse para aplicação nas células tumorais.

3.3.2 Método Soxhlet

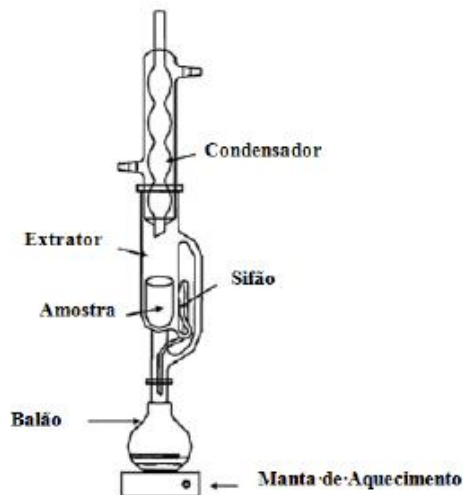
A extração Soxhlet foi originalmente desenvolvida para determinação de gordura em leite e hoje é um dos métodos mais utilizados em escala laboratorial para extração de matrizes sólidas. Por quase um século essa técnica foi um dos únicos métodos a ser seguido e ainda permanece como a referência em extração, sendo comparada com novos métodos (CASTRO; GARCÍA-AYUSO, 1998; CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2010).

O processo de extração por esse método ocorre de forma contínua, considerado um caso particular da lixiviação em que o soluto de interesse é extraído da matéria-prima por meio de um solvente aquecido em refluxo contínuo. O equipamento, representado pela Figura 4, faz com que o solvente inserido em um balão, aquecido até o seu ponto de ebulição, ascenda na forma de vapor até um condensador e desça liquefeito até o extrator, onde entra em contato com a amostra. O solvente permanece em contato com a matéria-prima até que se atinja um determinado nível, no qual um sifão faz com que o solvente retorne para o balão, já com o extrato. Esse procedimento se repete até completa extração da matéria-prima ou por um tempo determinado. Além disso, o procedimento conta sempre com o solvente puro cada vez que entra em contato com a matéria-prima, potencializando a extração. Como o material extraído permanece em contato com o solvente em ebulição durante todo o procedimento, podem ocorrer alterações e transformações químicas nos componentes extraídos (CASTRO; GARCÍA-AYUSO, 1998; MELECCHI, 2005).

O processo, de forma geral, produz altos rendimentos por fazer com que o solvente em contato com a amostra seja sempre renovado (já que o extrato permanece no balão). Após o processo de extração, há necessidade de mais uma etapa, a recuperação do solvente. Na maioria dos casos, a temperatura de extração e a natureza do solvente determinam o poder de dissolução do soluto de interesse. Mesmo sendo um método amplamente utilizado na extração de compostos orgânicos, ele apresenta restrições ligadas à baixa seletividade entre solvente e a amostra e ao

elevado tempo de extração, que pode variar de 1 a 72 horas (CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2010; MELECCHI, 2005).

Figura 4 – Extrator Soxhlet convencional



Fonte: Castro e Priego-Capote (2010).

Esse processo faz uso de grande quantidade de solvente altamente purificados, associando um alto custo de obtenção e disposição, resultando ainda em uma grande quantidade de resíduo prejudicial ao meio ambiente e em extratos não totalmente livres do solvente. Ampliando em escala industrial, o uso desses solventes pode ser um fator limitante para aplicação deste método, além do emprego de altas temperaturas (BISCAIA, 2007; CASTRO; ARCÍA-AYUSO, 1998; CASTRO; PRIEGOCAPOTE, 2010).

Mesmo assim, a extração pelo Soxhlet é muito utilizada em laboratório para comparação com outros métodos de extração devido as vantagens como: renovação do solvente durante o processo, sempre mantendo o solvente puro na extração dos compostos de interesse, aumentando a eficiência da extração; dispensa do processo de filtração, o que simplifica o tempo de manuseio do extrato após a extração e os riscos de perda e/ou contaminação do extrato; além de apresentar boa reprodutibilidade (BISCAIA, 2007; CASTRO; GARCÍA-AYUSO, 1998; CASTRO; PRIEGOCAPOTE, 2010).

3.3.3 Método de Imersão

O método de extração por imersão é uma adaptação do equipamento Clevenger. Este aparelho é formado por um balão de fundo redondo que é acoplado

a um condensador. O solvente e a amostra são adicionados ao balão e então inseridos em um banho com circulação de água que fornece o aquecimento ao processo. Esse aquecimento do solvente proporciona uma maior eficiência na extração (BIASI; DESCHAMPS, 2009).

Com o tempo, o solvente aquecido evapora, chegando ao condensador que retorna o solvente ao balão. Nesse método o solvente passa todo o período de tempo em contato com a matéria-prima, uma desvantagem quando se comparado com o método Soxhlet, pois o solvente pode saturar durante o processo, ocasionando uma extração menos eficiente (BIASI; DESCHAMPS, 2009).

O método de imersão conta somente com o balão de fundo redondo imerso em um banho de aquecimento, não necessitando do condensador. Esse método é utilizado para extrações realizadas em baixas temperaturas, onde não atinge o ponto de ebulição dos solventes, conseqüentemente, não necessitando do condensador para retornar o mesmo ao balão.

Neste trabalho, utilizou-se apenas a imersão em balão de vidro, visto que não se pretendia atingir a temperatura de ebulição dos solventes para o processo de extração, uma vez que o objetivo foi realizar a extração em baixa temperatura para manter os compostos termossensíveis no extrato.

A obtenção de extratos com a maior quantidade de compostos biocompostos é importante porque estes podem ser utilizados em diversas áreas, em especial a farmacêutica, na busca de medicamentos com atividades antitumorais.

3.4 CÂNCER E ATIVIDADES CITOTÓXICAS/ANTITUMORAIS EM CULTURA DE CÉLULAS

De acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2018), o câncer é uma patologia definida por um crescimento descontrolado de células, sendo que alterações essenciais transformaram células normais em cancerosas, através de mutações em células somáticas. Existem inúmeros tipos de canceres que correspondem aos variados tipos células do corpo, invadindo diferentes tipos de tecidos, órgãos vizinhos ou distantes.

O câncer pode ter diversas causas, podendo ser externas ou internas ao organismo. As causas externas estão ligadas ao meio ambiente e aos hábitos ou costumes do indivíduo. Já as causas internas são, na maioria das vezes,

geneticamente pré-determinadas e estão relacionadas a capacidade do organismo de se defender das agressões externas (INCA, 2018).

No desenvolvimento da sociedade, os fatores exógenos são responsáveis por 75-80% dos casos de câncer (BONT; LAREBEKE, 2004). Desta forma, deve-se dedicar atenção o estudo e o uso das técnicas que detectem e mostrem o modo de ação e os meios de prevenir o incremento de mutações.

Existem três possíveis formas de tratamento do câncer: excisão cirúrgica, irradiação quimioterapia e terapia biológica. Dentre essas, a que mais se destaca é a quimioterapia, onde há o emprego de substâncias químicas que atuam nas células, interferindo no processo de crescimento e divisão celular. Embora a quimioterapia tenha apresentado um resultado efetivo para o tratamento do câncer, seu uso gera vários efeitos colaterais por atuar em todas as células do organismo que se encontram na fase de divisão celular (REIS et al., 2008).

Nesse contexto, busca-se ampliar o conhecimento de alternativas complementares de tratamento para o câncer, como a utilização de antioxidantes com atividades antitumorais, através do uso de alimentos bioativos, visto que a ingestão de alimentos é um dos principais caminhos de exposição do homem a diferentes compostos.

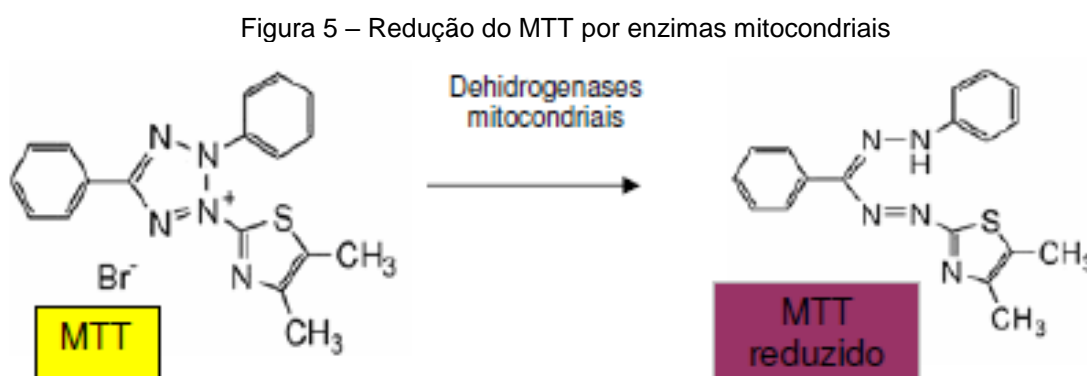
Diversos testes citogenéticos podem ser utilizados para realizar o monitoramento das populações expostas a agentes citotóxicos ou mutagênicos. Dentre estes sistemas, destacam-se as culturas de células *in vitro*, como a cultura de linfócitos humanos e as linhagens celulares provenientes de hamster chinês, como as células CHO (*Chinese Hamster Ovary*), células V79 (pulmonares) e CHL/IU (*Chinese Hamster Lung*) (TAKAHASHI, 2003).

Os estudos *in vitro* podem variar na utilização de modelos animais ou humanos e têm contribuído para identificar um grande número de agentes que podem ser capazes de reduzir o desenvolvimento de câncer e de outras doenças relacionadas a mutações (DE FLORA; FERGUSON, 2005). Destacam-se pelo fato de que os estudos são direcionados às células de interesse, ou seja, aos tecidos alvos (RABELLO-GAY; RODRIGUES; MONTELEONE-NETO, 1991).

Algumas linhagens de células hepáticas, como as células HTC (*Hepatoma Tissue Culture*), são muito utilizadas em estudos de citotoxicidade e mutagenicidade, visto que o fígado é o principal sítio de metabolização de xenobióticos. As células HTC são células cancerosas obtidas de fígado de *Rattus norvegicus* (MAZZEO, 2009).

A citotoxicidade é considerada como o potencial de um composto para induzir a morte celular. As células respondem rapidamente à substância tóxica alterando as taxas metabólicas, o crescimento celular ou a transcrição genética para controlar suas funções celulares básicas, ocorrendo então a morte celular (EISENBRAND et al., 2002). Desta forma, testes de citotoxicidade *in vitro* são úteis para definir a capacidade de um composto provocar a morte de células, como consequência dos danos nas funções celulares essenciais. Testes de citotoxicidade também são necessários para definir a faixa de concentração a ser testada com relação aos parâmetros de genotoxicidade, mutagenicidade ou morte celular programada (EISENBRAND et al., 2002).

O teste quantitativo *in vitro* denominado de ensaio do MTT (Dimetiltiazol Difenil Tetrazolium) foi desenvolvido por Mosmann, em 1983. Este método baseia-se na capacidade da succinato desidrogenase, uma enzima do ciclo de Krebs, ativa em mitocôndrias de células vivas, em converter o sal tetrazólio (MTT), reação reapresenta da Figura 5. A quantidade de formazan gerada é diretamente proporcional ao número de células vivas (MOSMANN, 1983). As vantagens do ensaio do MTT são a sua rapidez, precisão e o fato de não utilizar radioisótopos (MOSMANN, 1983). O metil metanossulfonato (MMS), utilizado como controle positivo nos testes de citotoxicidade do MTT, provoca a morte celular por apoptose (JIANG et al., 2012).



Fonte: Gomes (2008).

4 METODOLOGIA

4.1 OBTENÇÃO E PRÉ-TRATAMENTO DA MATÉRIA-PRIMA

O bagaço de uvas orgânicas das variedades “Isabel” e “Bordô” (*Vitis labrusca* L.) foi obtido de uma indústria de fabricação de sucos de uva do município de Verê, região Sudoeste do estado do Paraná (25°52'51"S e 52°54'28"W), localizada a uma altitude média de 495 metros, com clima sub-tropical úmido mesotérmico. Durante todo transporte, desde a coleta até a chegada ao laboratório, a matéria-prima foi acomodada em sacos de plástico preto fechados, visando minimizar as possíveis reações de oxidação.

Primeiramente foi realizada uma pré-limpeza do bagaço, a fim de retirar possíveis engaços, restando somente cascas e sementes. Em seguida, realizou-se a determinação da umidade e o pré-tratamento da matéria-prima por meio da secagem e da moagem do bagaço. Escolheu-se aplicar a operação unitária de secagem no bagaço de uva para que se diminuísse a atividade de água na matéria-prima e assim ter a conservação do bagaço por mais tempo. Para executar esse processo, o bagaço foi colocado em uma estufa com circulação de ar, por 48 horas a uma temperatura de 50 °C e então foi feita a determinação da umidade. A escolha da temperatura foi influenciada pela necessidade de que ocorresse a evaporação da água da amostra sem que a própria temperatura afetasse os compostos termossensíveis.

Em seguida, a amostra foi submetida a um processo de moagem, através de um moedor industrial com constância de 2 minutos, seguidos de 2 minutos de descanso para que não ocorresse o aquecimento da amostra. A moagem de sólidos promove a homogeneização da amostra e a redução do tamanho das partículas, aumentando a superfície de contato entre a própria amostra e o solvente, facilitando assim a extração de compostos de interesse.

Após todos os procedimentos citados acima, ocorreu o acondicionamento da matéria-prima em freezer doméstico a -18 °C.

4.2 DETERMINAÇÃO DA UMIDADE DO BAGAÇO

Realizou-se a determinação da umidade do bagaço inicial e do bagaço após o pré-tratamento por meio da metodologia proposta pelo Instituto Adolfo Lutz em

Métodos Físico Químicos para Análise de Alimentos (2008). Para a realização desse procedimento, amostras de aproximadamente 5 g, em triplicata, foram pesadas e então colocadas em uma estufa por 3 horas, a uma temperatura de 105°C. Em seguida, as amostras foram novamente pesadas.

Colocou-se mais uma vez as amostras na estufa por uma hora, a mesma temperatura, para certificar-se de que o processo retirou a umidade das amostras, através da observação de peso constante. A razão entre a diferença da massa inicial e final (perda de massa durante o processo) pela massa inicial, gera o valor da umidade contida em cada uma das amostras (Equação1).

$$Umidade = \frac{100 \times N}{P} \quad (1)$$

Onde:

N = massa de umidade (perda de massa em [g]);

P = massa da amostra inicial [g].

4.3 DIÂMETRO DAS PARTÍCULAS DO BAGAÇO

Para a determinação do diâmetro das partículas do bagaço de uva, de acordo com o método oficial da ASAE – American Society of Agricultural Engineers (1998) foram selecionadas peneiras de 8, 9, 28, 42, 115 e 325 Mesh e montou-se o sistema de peneiramento industrial. Ajustou-se o equipamento para 10 vibrações por segundo em um tempo de 15 minutos. Em seguida, pesou-se as peneiras e se obteve a massa retida em cada uma delas.

Como os dados de abertura das peneiras, fornecidos pelo fabricante, calculou-se o diâmetro médio das partículas pela Equação 2.

$$d_{mg} = 10^{\left[\frac{\omega_i \log \bar{d}_i}{\omega_i} \right]} \quad (2)$$

Onde:

$$\bar{d}_i = (d_i * d_{i+1})^{1/2};$$

d_i = Abertura da peneira [mm];

ω_i = Massa retida na peneira [g].

4.4 EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS DE INTERESSE

A extração dos compostos bioativos do bagaço de uva foi realizada pelo método de imersão. A matéria-prima, reservada dentro de um balão de fundo redondo isento de luz, ficou submersa no solvente por três horas, sendo aquecida por um banho com circulação de água, a uma temperatura de 35 °C. Utilizou-se uma razão de S/F (solvente/massa) = 75. Aplicou-se como solventes na extração o etanol anidro (99% de pureza) e acetato de etila (99,5% de pureza), de acordo com a metodologia proposta pelo Instituto Adolfo Lutz em Métodos Físico Químicos para Análise de Alimentos (2008). Após a etapa de extração, ocorreu a separação do solvente e do extrato por meio de rotoevaporação.

Realizou-se também a extração dos compostos bioativos por intermédio do Soxhlet (1879), para a comparação do rendimento dos extratos por diferentes métodos.

A extração pelo método do Soxhlet foi feita através do armazenamento da amostra (5g) em um cartucho de papel filtro quantitativo que foi colocado no aparelho, sendo esse formado por um tubo extrator, um balão de fundo redondo e um condensador, onde o tubo extrator foi conectado a um balão que continha o solvente selecionado para a extração e que estava em ebulição. Os solventes utilizados nesse método foram: o etanol anidro (99% de pureza), acetato de etila (99,5% de pureza) e hexano anidro (solvente indicado pela metodologia oficial).

O balão foi aquecido através de uma manta de aquecimento e o solvente foi adicionado até completar 2/3 do balão. O solvente começou a evaporar e chegou ao braço do tubo extrator, onde ocorreu a condensação do mesmo que acaba gotejando sobre o cartucho de papel de filtro. O tubo extrator possui um pequeno braço retorcido (sifão), que retorna o solvente para o balão. Ao encher o recipiente até a altura da dobra do sifão, o solvente, contendo parte da substância dissolvida, voltou ao balão completamente através do sifão. O solvente evaporou novamente, deixando a substância dissolvida no balão. Todo o processo aconteceu em oito horas e em triplicata.

4.5 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS

Os extratos obtidos pelo método de imersão através dos solventes etanol e acetato de etila foram caracterizados através da determinação do potencial antioxidante. Dessa forma, diluiu-se 1 grama de cada extrato em 25 mL de etanol 80% durante 5 minutos em homogeneizador. O resultante foi levado a centrífuga durante 5 minutos a 3.000 rpm. Em seguida, retirou-se o sobrenadante e adicionou-se mais 25 mL de etanol 80% ao precipitado, que foi novamente homogeneizado, voltando à centrífuga por igual tempo e rotação. Os precipitados e os extratos foram separados e armazenados no congelador para realização das análises.

Determinou-se a atividade sequestrante de radicais livres a partir de curva padrão de Trolox®-DPPH. Para isso, preparou-se uma solução metanólica de Trolox® 20 µM e diluiu-se essa solução mãe em outras nas concentrações de 0,1; 0,5; 1,0; 2,0 e 3,0 µM. De cada uma dessas diluições foram transferidos 20, 100, 200, 300 e 600 µL para tubos de ensaio e então se adicionou 4 mL da solução de DPPH a 0,06M (diluído em etanol). Em seguida, procedeu-se a leitura em espectrofotômetro a 515 nm após 30 minutos, tendo a leitura do DPPH como branco. A curva padrão de Trolox gerou uma equação que foi utilizada para quantificar o potencial antioxidante dos novos extratos produzidos. O resultado final foi expresso em capacidade antioxidante equivalente a Trolox® relativa (TEAC – Trolox® Equivalent Antioxidant Capacity) em µM TEAC/100 g de extrato.

A análise das amostras de cada extrato aconteceu em um ambiente escuro, onde uma alíquota de 0,1 mL de cada extrato foi transferida para tubos de ensaio juntamente com 3,9 mL da solução de DPPH. Em seguida, ambas as amostras foram homogeneizadas em um agitador de tubos.

Um controle foi realizado através de 0,1 mL da solução de álcool metílico com 3,9 mL da solução de DPPH, que também foi homogeneizada.

As leituras das absorbâncias foram realizadas após 30 minutos de reação a 515 nm. As concentrações de atividade antioxidante equivalente ao Trolox dos extratos foram calculadas através da equação da reta gerada pela curva padrão de Trolox.

4.6 TESTE DE ATIVIDADE CITOTOXICA/ANTITUMORAL

As células HTC, derivadas de hepatoma de *Rattus norvegicus*, foram cultivadas em frascos de cultura de 25 cm², contendo 10 mL de meio de cultura

DMEM, suplementado com 10% de soro bovino fetal, e incubadas em estufa do tipo BOD a 37 °C.

O ensaio de citotoxicidade do MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-il) -2,5-diphenil tetrazolium bromide seguiu o protocolo sugerido por Mosmann (1983). Foram utilizadas placas de cultura celular de 96 poços, onde em cada poço foram semeadas $2,0 \times 10^4$ células. Após 24 horas, o meio de cultura de cada poço foi descartado e foi adicionado 100 μ L de meio novo com os tratamentos: controle negativo (meio de cultura), tratamento com o agente citotóxico metil metanossulfonato (MMS) (concentração final de 500 μ M), e tratamentos com os extratos de bagaço de uva obtidos com o solvente etanol e acetato de etila em concentrações definidas após testes-piloto de: 50, 75, 100, 150, 200, 250, 500, 750, 1000 e 2500 μ g de extrato/mL de meio de cultura. As concentrações do extrato obtido pelo etanol foram diluídas em meio de cultura não suplementado e as concentrações do extrato obtido pelo acetato de etila foram diluídas em meio de cultura não suplementado mais o próprio solvente (5 μ L acetato de etila/mL meio de cultura).

As células foram incubadas por 24, 48 e 72 horas e, após este tempo, o meio de cultura foi substituído por 100 μ L de meio livre de soro, acrescido de MTT na concentração de 0,167 mg/mL. A placa foi incubada por mais 4 horas e, na sequência, o meio contendo MTT foi descartado e aos poços foram adicionados 100 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO), ocorrendo a diluição dos cristais de formazan formados. A leitura foi realizada em leitor de microplacas (FlexStation) a 492nm e os dados foram expressos pelas médias das absorbâncias obtidas nas três repetições biológicas. A análise estatística foi realizada por análise de variância (one way ANOVA), seguida pelo teste de Dunnet ($\alpha=0,05$, $p<0,05$, $n=3$), pelo Programa GraphPad InStat.

Os valores percentuais de viabilidade celular (VC) foram estimados através da Equação 3.

$$VC = \left(\frac{ABS_T}{ABS_C} \right) \times 100 \quad (3)$$

Onde:

VC = Viabilidade celular [%];

ABS_T = Absorbância do tratamento;

ABS_C = Absorbância do controle negativo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 UMIDADE E DIÂMETRO DAS PARTÍCULAS

Para avaliar quais etapas deveriam ser desenvolvidas no pré-tratamento da matéria-prima, determinou-se a umidade do bagaço de uva coletado em janeiro de 2017 (Tabela 1). Os dados mostram que o bagaço bruto inicial continha uma grande quantidade de água na amostra, cerca de 78% em massa, e isso é desfavorável para a extração, visto que a água pode vir a competir com o solvente utilizado, alterando a composição e o rendimento do extrato.

Tabela 1 – Umidade da amostra bruta do bagaço de uvas orgânicas

Amostra	Massa inicial [g]	Massa final [g]	Umidade [%]
1	5,440	1,170	78,493
2	5,550	1,210	78,198
3	5,520	1,260	77,174
Média	5,503	1,213	77,955

Fonte: Autoria própria.

De acordo com Campos (2005), a umidade encontrada no bagaço de uva bruto inicial da variedade *V. vinífera* foi de 50%, sendo aumentada para 63% em um ano de armazenamento no congelador. De forma parecida, Oliveira (2010) encontrou uma umidade inicial no bagaço bruto de uva das variedades *Syrah*, *Merlot Cabernet* e *Sauvignon* de 56%, 64% e 64%, respectivamente. Já Rockendbach et al. (2007) encontrou uma umidade inicial de 77% na variedade *V. vinífera* e de 80% na variedade Regente. Sabe-se também que a época de colheita influencia na umidade da amostra.

Dessa forma, adicionou-se mais uma operação unitária ao processo para a retirada da água, incluindo então a secagem no pré-tratamento. Em seguida, determinou-se também umidade do bagaço após a secagem e o armazenamento (Tabela 2). Os dados mostram que mesmo retirando a água do bagaço bruto inicial, depois de ficar armazenada em um freezer doméstico por um ano e meio, o bagaço absorveu umidade, atingindo um valor de 9,796%. Segundo Campos (2005), o bagaço de uva seco e armazenado por um ano aderiu cerca de 9,75% de umidade, valor bem próximo ao encontrado no presente experimento.

Com a finalidade de proporcionar uma maior área de contato entre soluto e solvente, aumentou-se a superfície de contato das partículas através da moagem do bagaço e, então, classificou-se o diâmetro médio das partículas com a operação unitária de peneiramento (Tabela 3). Os dados mostram que o diâmetro médio das

partículas do bagaço, após o processo de moagem, foi de 0,700 mm e mais de 50% da massa utilizada ficou retida na peneira de 28 Mesh, demonstrando que há uma concentração de partículas com diâmetro superior que 0,600 mm. No entanto, cerca de 30% da massa usada no experimento ficou retida em peneiras com diâmetros entre 0,046 a 0,355 mm. Vale ressaltar que não se obteve massa significativa no fundo (panela) do módulo de peneiramento, indicando que as menores partículas possuem um diâmetro de no mínimo 0,046 mm.

Tabela 2 – Umidade da amostra de bagaço de uvas orgânicas após a secagem e armazenamento

Amostra	Massa inicial [g]	Massa final [g]	Umidade [%]
1	5,013	4,528	9,658
2	5,020	4,530	9,803
3	5,008	4,524	9,928
Média	5,503	4,527	9,796

Fonte: Autoria própria.

Tabela 3 – Diâmetro médio das partículas do bagaço de uvas orgânicas

Peneira [Mesh]	Abertura da peneira [mm]	Massa retida [g]	Massa retida [%]	Diâmetro médio das partículas [mm]
8	2,380	12,320	12,134	
9	2,000	5,860	5,758	
28	0,600	53,660	52,722	
42	0,355	10,120	9,943	
115	0,125	12,870	12,645	0,700
325	0,046	6,920	6,799	
Fundo	-	-	-	
Total	-	101,780	100,000	

Fonte: Autoria própria.

Conforme Campos (2005), o diâmetro médio das partículas do bagaço de uva moído foi de 0,910 mm, porém o método de determinação utilizado foi o de microscopia eletrônica. Oliveira (2010) utilizou o mesmo método de determinação que o realizado nesse experimento e encontrou um diâmetro médio de partículas trituradas de 0,680 mm para todas as variedades, sendo elas *Syrah*, *Merlot Cabernet* e *Sauvignon*. Com a utilização do mesmo método de determinação, os valores obtidos experimentalmente, quando comparados com a literatura, são bem próximos.

5.2 EXTRAÇÃO PELO MÉTODO DE IMERSÃO E SOXHLET

Como o objetivo maior do presente estudo era a produção de um extrato qualitativo, com a presença de biocompostos, incluindo os compostos termossensíveis, buscou-se outros métodos de extração diferentes do oficial (Soxhlet), visto que esse método utiliza o solvente a temperatura de ebulição, o que

pode afetar os compostos de interesse. Dessa forma, extraiu-se utilizando o método de imersão e os resultados, com os dois solventes, encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4 – Rendimento de extração do bagaço de uvas orgânicas, pelo método de imersão, utilizando como solvente o etanol e o acetato de etila

Solvente	Polaridade	Massa de bagaço utilizado [g]	Volume de solvente utilizado [L]	Massa do extrato obtido [g]	Rendimento [%]
Etanol	5,2	40,016	3,000	4,102	8,948
Acetato de etila	4,4	60,339	4,500	3,109	5,153

Fonte: Autoria própria.

Observando os dados, identifica-se que a extração utilizando o etanol possui um rendimento maior que a extração utilizando o acetato de etila. Isso indica que os compostos presentes no bagaço de uva, considerando cascas e sementes, possuem características mais polares, pois se solubilizaram em maior quantidade no etanol que possui uma polaridade maior. Por outro lado, também houve a extração de compostos que possuem características apolares, uma vez que o acetato de etila possui uma polaridade menor e acaba interagindo com os compostos apolares.

Houve um maior rendimento de compostos polares do que os apolares, visto que na casca da uva existe uma ampla quantidade de antocianinas, compostos que possuem características polares; além disso, esta compõe grande parte do bagaço total. Já nas sementes, que estão presentes em menor quantidade, há uma concentração de óleos essenciais que possuem características apolares (SOUQUET et al., 1996). Por isso, foi importante aplicar dois solventes distintos, com grupos funcionais diversificados e, possivelmente, a obtenção de diferentes compostos extraídos.

Realizou-se também a extração dos compostos pelo método oficial, utilizando o Soxhlet (Tabela 5), aplicando como solvente o etanol, o acetato de etila e o hexano. Extraiu-se com o hexano somente como um parâmetro comparativo para a extração, visto que é um dos solventes mais utilizados, com um altíssimo poder de solvência e alto rendimento, além de possuir um baixo custo. Os dados mostra que a extração com o solvente etanol continua sendo a maior, seguida do acetato de etila e por último o hexano. Isso reitera os dados obtidos com a extração pelo método de imersão, onde os compostos polares foram extraídos em maior quantidade no solvente mais polar (etanol), seguindo do solvente menos polar (acetato de etila) e com um baixo rendimento para o solvente apolar (hexano).

Tabela 5 – Rendimento de extração do bagaço de uvas orgânicas, pelo método Soxhlet, utilizando como solvente o etanol, o acetato de etila e o hexano

Solvente	Amostra	Polaridade	Massa de bagaço utilizado [g]	Massa do extrato obtido [g]	Rendimento [%]
Etanol	1	5,2	5,023	0,923	19,649
	2		5,011	1,014	
	3		5,042	1,026	
Acetato de etila	1	4,4	5,055	0,543	11,024
	2		5,011	0,515	
	3		5,012	0,602	
Hexano	1	0	5,017	0,267	5,587
	2		5,024	0,281	
	3		5,019	0,294	

Fonte: Autoria própria.

Da mesma forma, Oliveira (2010) encontrou a mesma ordem de rendimento no seu experimento, onde a extração pelo método com Soxhlet utilizando os solventes etanol, acetato de etila e hexano obtiveram, respectivamente, um rendimento de 14,6%, 12,3% e 10% para a variedade *Merlot* e um rendimento de 14%, 10,4% e 10% para a variedade *Syrah*.

O hexano é um solvente amplamente aplicado na extração de compostos obtidos através de sementes, pois elas armazenam uma grande quantidade de óleos essenciais. Como nesse experimento se utilizou o bagaço bruto, sem nenhuma separação, o hexano não se apresentou como um solvente eficiente para o processo.

Comparando o rendimento entre os mesmos solventes para os dois métodos de extração aplicados, nota-se que o Soxhlet apresentou maiores resultados. Isso se explica pelo fato de que seu procedimento envolve a utilização da temperatura de ebulição do solvente e, assim, com uma maior temperatura no processo, o solvente pode alcançar os espaços da matriz que contém os solutos com maior facilidade, solubilizando uma maior quantidade destes (MARKON et al., 2007). Porém a qualidade do extrato fica comprometida, sendo que alguns compostos podem ser afetados, principalmente os termossensíveis.

Dessa forma, os extratos utilizados para a caracterização dos compostos e para a aplicação nas células tumorais de fígado de rato foram os obtidos pelo método de imersão, visando a aplicação de um extrato qualitativo e não quantitativo.

5.3 POTENCIAL ANTIOXIDANTE

Após realizar a curva padrão do Trolox, plotou-se os dados obtidos de absorvância e encontrou-se a Equação 4, com um coeficiente de correlação de 0,9714.

$$C = 4,0425 \times ABS - 0,1447 \quad (4)$$

Onde:

C = concentração de capacidade antioxidante equivalente a Trolox [μ M TEAC/100 g de extrato];

ABS = absorvância;

De acordo com Figueiredo Filho e Silva Júnior (2009), o coeficiente de correlação representa uma medida de associação linear entre as variáveis. Pode variar entre -1 a 1, sendo que o sinal sugere a direção positiva ou negativa do relacionamento e o valor indica a força da relação entre as variáveis. Se uma correlação é perfeita, apresentando um R = -1 ou 1, a variável pode ser determinada exatamente ao se saber o valor da outra. Na prática, dificilmente são encontradas correlações com valores iguais a 1 ou -1, então interpretam-se a magnitude dos coeficientes de correlação.

Nota-se que o coeficiente de correlação obtido para a curva de calibração do Trolox foi 1, pois o DPPH é bem sensível e manipulá-lo se torna algo dificultoso. Segundo Dancey e Reidy (2005), se o R estiver dentro do intervalo de 0,70 até 1 a correlação é considerada forte, atestando que a curva gerada pode representar com efetividade os valores de concentração. Além disso, Vedana et. al (2008) determinaram os valores das concentrações do potencial antioxidante com um coeficiente de correlação de 0,9057.

Através da curva padrão e com os valores obtidos de absorvância, calculou-se a concentração de potencial antioxidante dos extratos (Tabela 6). Observa-se que os valores encontrados para o potencial antioxidante dos extratos do presente estudo, obtidos a partir do bagaço de uva orgânica, por meio do método de imersão, são baixos, sendo: 196,5 μ M TEAC/100 g de extrato etanólico e 178,8 μ M TEAC/100 g de extrato com o acetato de etila. De acordo com Abe et. al (2007), a capacidade antioxidante, para diferentes variedades de uva, foi na faixa de 270 a 1900 μ M TEAC/100 g de extrato.

Tabela 6 – Potencial antioxidante dos extratos do bagaço de uvas orgânicas, obtidos com o solvente etanol e acetato de etila

Amostra	Absorbância	Concentração [$\mu\text{M TEAC}/100\text{ g}$ de extrato]
Etanol	0,522	196,5
Acetato de etila	0,478	178,8

Fonte: Autoria própria.

Segundo Vedana et.al (2008), o potencial antioxidante da espécie *V. labrusca* de uva *in natura*, também com extratos hidroalcoólicos a frio, foi de 610 $\mu\text{M TEAC}/100\text{ g}$ de extrato. Para amostras de geleia e suco, encontrou-se um potencial antioxidante menor, cerca de 285,6 e 322,0 $\mu\text{M TEAC}/100\text{ g}$ de extrato, indicando que com um maior processamento da fruta o potencial antioxidante diminui, pois são sensíveis a temperatura.

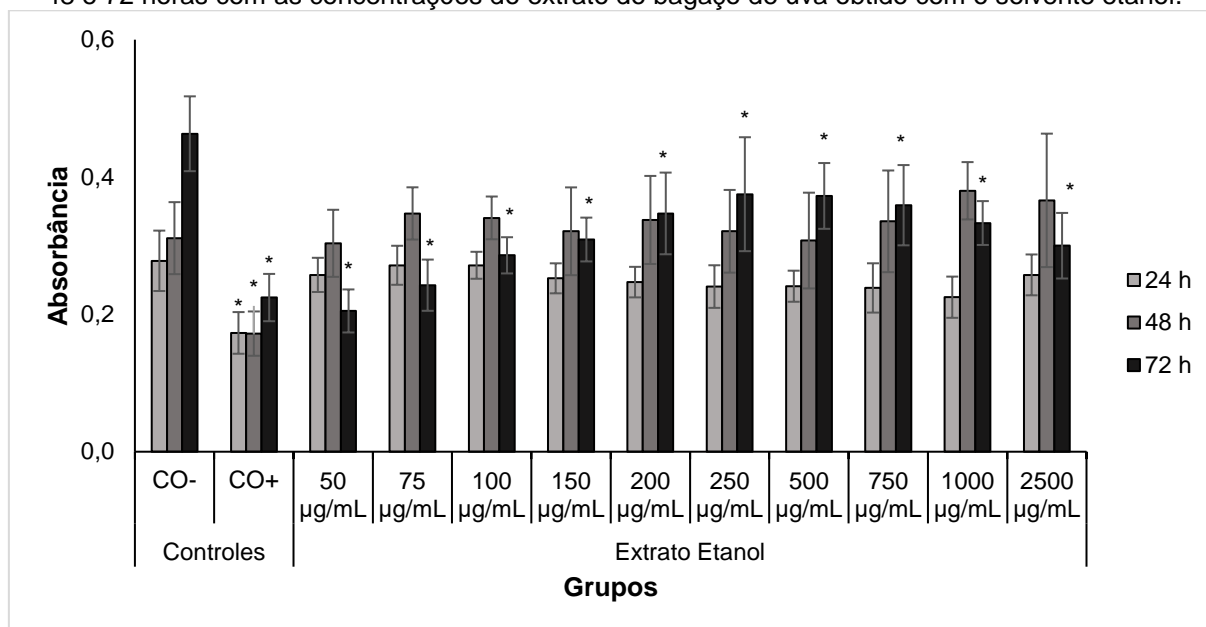
Dessa forma, nota-se que a concentração do potencial antioxidante obtida através dos extratos do bagaço de uva é menor do que o da fruta *in natura*, mas os extratos ainda mantem esse potencial. Isso se deve a dois fatores: a matéria-prima trabalhada, sendo que o extrato foi obtido através do resíduo de indústria vinícola e não da própria fruta; e a temperatura utilizada no processo, sendo que durante a produção dos sucos e geleias, e também na extração de compostos de interesse (presente estudo), mesmo sendo considerada uma temperatura branda (35°C), pode ter afetado os compostos que são termossensíveis. Nota-se que o potencial antioxidante encontrado no extrato etanólico foi maior do que o extrato com o acetato de etila, indicando que o solvente etanol extraiu maior quantidade de compostos antioxidantes do bagaço de uva do que o acetato de etila.

5.4 CITOTOXICIDADE/ATIVIDADE ANTITUMORAL

Os dados do teste de citotoxicidade/atividade antitumoral do extrato do bagaço de uvas orgânicas com o solvente etanol (Figura 6) mostram que, no tempo de 24 horas, somente o controle positivo apresentou um resultado estatístico diferente ao do controle negativo, sendo citotóxico as células tumorais. Analisando a Tabela 7, percebe-se que a viabilidade celular do controle positivo foi cerca de 62%. Em contrapartida, nenhuma das concentrações testadas do extrato obtido com o solvente

etanol, em 24 horas, foram tóxicas as células HTC e, a viabilidade celular (Tabela 7) de todas as concentrações se manteve elevada, variando em torno de 80 a 97%.

Figura 6 - Absorbância média e desvio-padrão de células tumorais de fígado de rato tratadas por 24, 48 e 72 horas com as concentrações do extrato do bagaço de uva obtido com o solvente etanol.



Fonte: Autoria própria.

CO-: Controle Negativo; CO+: Controle Positivo; $2,0 \times 10^4$ células por poço.

* Resultado estatisticamente diferente do controle negativo (Teste de Dunnet, $p < 0,05$).

De acordo com Sales (2013), experimento realizado com o extrato do bagaço de uva obtido por meio do etanol 30%, a 50°C, com 30% de etanol no extrato final e em células tumorais de fígado humano, as concentrações 5,4; 13,5; 27 e 54 µg/mL foram citotóxicas as células no período de 24 horas. Estes resultados divergem dos do presente estudo, possivelmente, pela presença de etanol nos tratamentos realizados. Além disso, a temperatura de extração utilizada foi maior, o que pode ter resultado na obtenção de uma maior quantidade de compostos bioativos antioxidantes e antitumorais. Gessner (2011), avaliando a diluição de 1×10^2 do extrato etanólico de farelo de semente de uva obteve citotoxicidade em relação as células Caco-2, em um período de 24 horas, diferentemente dos resultados do presente estudo com células HTC, o que pode indicar efeito seletivo de toxicidade de acordo com o tipo de célula tumoral.

No tempo de 48 horas (Figura 6), todas as concentrações do extrato etanólico não foram citotóxicas para as células HTC. Inclusive, a absorbância aumentou do tempo de 24 para 48 horas para todas as concentrações testadas, sendo as maiores variações observadas para as concentrações de 750, 1000, 2500 µg/mL. Avaliando

as viabilidades celulares nesse tempo (Tabela 7), constata-se que a concentração mais baixa, 50 µg/µL, apresentou um valor de 97% e, aumentando a concentração, a viabilidade aumentou ainda mais, ultrapassando 100% e chegando até a 122%. Esses resultados indicam que o extrato do bagaço de uva obtido com o solvente etanol estimulou a proliferação das células HTC após 48 horas de tratamento, pois, segundo Mosmann (1983) a quantidade de formazan gerada pelas enzimas mitocondriais a partir do sal tetrazólio (MTT) é diretamente proporcional a quantidade de células vivas. Logo, somente as células vivas possuem a capacidade de converter as enzimas nos cristais de formazan que são lidos pelo o espectrofotômetro (COLLIER; PRITSOS, 2003).

Tabela 7 - Percentual de viabilidade de células (VC) tumorais de fígado de rato, tratadas com o extrato do bagaço de uva obtido com o solvente etanol, por 24, 48 e 72 horas, pelo teste do MTT.

Grupos	Célula Tumoral Hepática de Ratos		
	VC [%]		
	24 h	48 h	72 h
CO -	100,000	100,000	100,000
CO+	62,230	55,305	48,488
50 µg/mL	92,626	97,588	44,276
75 µg/mL	97,662	111,576	52,376
100 µg/mL	97,662	109,486	61,771
150 µg/mL	90,827	103,215	66,739
200 µL/mL	88,849	108,521	74,946
Etanol 250 µg/mL	86,511	103,215	80,994
500 µg/mL	86,691	98,875	80,454
750 µg/mL	85,791	107,878	77,538
1000 µg/mL	80,935	122,186	71,922
2500 µg/mL	92,626	117,685	64,795

Fonte: Autoria própria.

CO-: Controle Negativo; CO+: Controle Positivo.

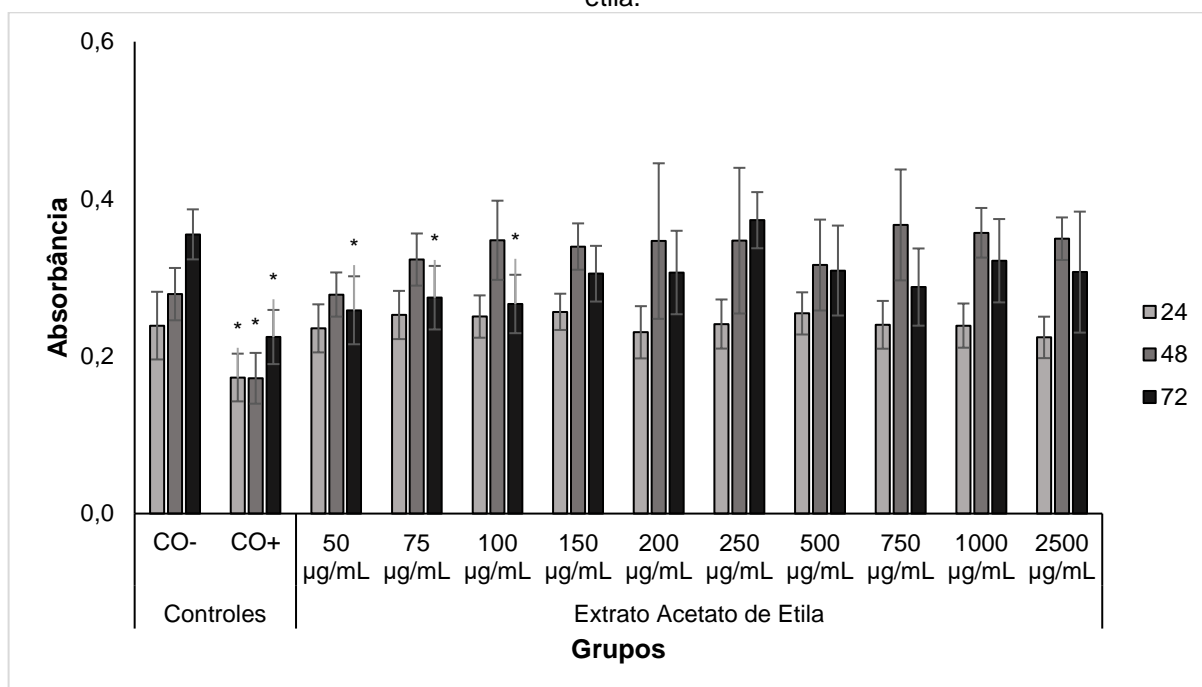
O estímulo do crescimento celular deve-se, possivelmente, a existência de biocompostos presentes no extrato, como vitaminas, compostos fenólicos, antioxidantes, dentre outros (AQUARONE et al., 2001; RIZZON; INK, 2006; RIZZON; MENEGUZZO, 2007; RIZZON; MIELE, 2012). Segundo Guéant et al. (2013) e Wang et al. (2014) as vitaminas atuam como promotoras do crescimento e da proliferação celular e, também no aumento da síntese de DNA, quando em concentrações apropriadas. Observa-se que o mesmo resultado foi encontrado por Düsman (2014), onde a viabilidade celular aumentou, utilizando como tratamento o suco integral e natural de uvas convencionais e orgânicas, em células HTC.

Esses resultados divergem dos encontrados por Martins (2016), onde as concentrações de 250, 500, 700 e 1000 µg do bagaço de uva/mL de meio de cultura foram citotóxicas para as células Caco-2002C em 48 horas. Assim, possivelmente devido ao sistema de metabolização das células hepáticas de rato, o extrato do bagaço de uva orgânica aplicado no presente estudo não apresentou efeito citotóxico, diferentemente do encontrado com as células não metabolizadoras de adenocarcinoma de colo intestinal.

Analisando o tempo de 72 horas (Figura 6), todas as concentrações testadas apresentaram absorvâncias médias estatisticamente menores do que a do controle negativo e, assim, potencial efeito citotóxico para células de fígado de rato. Com relação a viabilidade celular (Tabela 7), as menores concentrações, ou seja, 50, 75 e 100 µg/mL, apresentaram os menores percentuais, cerca de 44, 52 e 61%, respectivamente. Esse resultado pode estar associado a presença de antioxidantes no extrato etanólico (Tabela 6) e, assim, a atividade antitumoral que os antioxidantes exercem, visto que já foi mostrado que estes podem inibir a ação da topoisomerase II, impedindo o processo de duplicação e reparo celular, levando as células tumorais a morte (REBELLO, 2005). Além disso, os antioxidantes podem atuar nas vias de sinalização da proteína quinase, alterando o processo de transcrição e, conseqüentemente, a produção de proteínas necessárias para manter as células tumorais (WILLIAMS, 2004). Já Sánchez (2006) justifica que os antioxidantes possuem atividade antitumoral porque resultam em alterações metabólicas, restringindo a capacidade de proliferação de células tumorais através de alterações seletivas no ciclo celular, induzindo a ação mitocondrial intrínseca, além de reduzirem a produção de ribose e inibirem a glicólise das células tumorais, levando as células tumorais a apoptose.

Os dados do teste de citotoxicidade/atividade antitumoral do extrato do bagaço de uvas orgânicas com o solvente acetato de etila (Figura 7) mostram que, no tempo de 24 horas, somente o controle positivo apresentou um resultado estatístico diferente do controle negativo, sendo citotóxico as células tumorais. Analisando a Tabela 8, percebe-se que a viabilidade celular do controle positivo foi cerca de 72%. Em contrapartida, nenhuma das concentrações testadas do extrato obtido com o solvente acetato de etila, em 24 horas, foram tóxicas as células HTC e, a viabilidade celular de todas as concentrações se manteve elevada, variando de 93 a 107%.

Figura 7 - Absorbância média e desvio-padrão de células tumorais de fígado de rato tratadas por 24, 48 e 72 horas com as concentrações do extrato do bagaço de uva obtido com o solvente acetato de etila.



Fonte: Autoria própria.

. CO-: Controle Negativo; CO+: Controle Positivo; $2,0 \times 10^4$ células por poço.

* Resultado estatisticamente diferente do controle negativo (Teste de Dunnet, $p < 0,05$).

No tempo de 48 horas, todas as concentrações do extrato com acetato de etila não foram citotóxicas, inclusive, com viabilidades celulares superiores a 99% (Tabela 8). Pode-se notar também que, aumentando a concentração do extrato ocorreu aumento da viabilidade celular, ultrapassando 100% e chegando até a 127%. Esses resultados indicam que o extrato do bagaço de uva, obtido com o solvente acetato de etila, estimulou a proliferação das células HTC no tempo de 48 horas, semelhante ao encontrado com o extrato etanólico. Observando as viabilidades entre os tempos de 24 e 48 horas, comparando a mesma concentração, nota-se um aumento do

percentual em todas, sendo as maiores variações nas concentrações de 750, 1000, 2500 µg/mL, também semelhante ao observado para o extrato etanólico. Esse resultado indica, da mesma forma que ocorreu com o outro extrato, que o estímulo do crescimento celular se deve, possivelmente, a existência de biocompostos presentes no extrato, como vitaminas, compostos fenólicos, antioxidantes, dentre outros.

Tabela 8 - Percentual de viabilidade de células (VC) tumorais de fígado de rato, tratadas com o extrato do bagaço de uva obtido com o solvente acetato de etila, por 24, 48 e 72 horas, pelo teste do MTT.

Grupos	Célula Tumoral Hepática de Ratos		
	VC [%]		
	24 h	48 h	72 h
CO-	100,000	100,000	100,000
CO+	72,385	61,649	63,239
50 µg/mL	98,536	99,821	72,817
75 µg/mL	105,649	115,771	77,324
100 µg/mL	104,812	124,552	75,070
150 µg/mL	107,322	121,685	85,915
200 µL/mL	96,444	124,194	86,338
250 µg/mL	100,837	124,373	105,070
500 µg/mL	106,485	113,262	87,042
750 µg/mL	100,418	131,541	81,127
1000 µg/mL	100,000	127,957	90,563
2500 µg/mL	93,724	125,269	86,479

Fonte: Autoria própria.
CO-: Controle Negativo; CO+: Controle Positivo.

Estes resultados divergem dos encontrados por Sun et al. (2012), em que a concentração de 100 µg/mL do extrato de casca de uva foi citotóxica para as células de câncer de mama altamente metastáticas, no tempo de 48 horas. Indicando, novamente, efeito diferenciado de acordo com o tipo celular avaliado e o tipo de extrato produzido.

Analisando o tempo de 72 horas, as quatro menores concentrações testadas, 50, 75, 100 e 150 µg/mL, apresentaram absorvâncias médias estatisticamente menores do que a do controle negativo e, assim, potencial efeito citotóxico para células tumorais de fígado de rato. Com relação a viabilidade celular (Tabela 8), as três menores concentrações, ou seja, 50, 75 e 100 µg/mL, também apresentaram os menores percentuais, cerca de 72, 77 e 75%, respectivamente. Nota-se também que há um crescimento percentual na viabilidade celular da concentração de 50 µg/mL até 250 µg/mL, depois a viabilidade diminui, correspondendo a 86% na maior concentração (2500 µg/mL). Esse resultado antitumoral pode estar associado, novamente, a presença de antioxidantes no extrato, como indicado na Tabela 6.

Comparando o comportamento apresentado pelos dois extratos, nota-se que ambos se comportam de forma muito parecida. No tempo de 24 horas, nenhum dos extratos apresentou toxicidade para as células HTC. Além disso, somente o extrato obtido com o acetato de etila teve uma viabilidade celular maior do que 100% em praticamente todas as concentrações testadas. Esse resultado pode estar associado a composição de cada extrato, visto que o acetato de etila possui uma baixa polaridade e tende a extrair compostos apolares, ou seja, vitaminas do tipo A, D, E e K. Já o extrato obtido por meio do etanol teria compostos polares como as vitaminas B1, B2, B3, B5, B6, B12, C, H, M, P (HACCP, 2018).

No tempo de 48 horas, ambos os extratos aumentaram a viabilidade celular, se comparado ao tempo de 24 horas, passando de 100% para praticamente para todas as concentrações.

A grande diferença entre os dois extratos se encontra no tempo de 72 horas, onde o extrato etanólico foi citotóxico para todas as concentrações testadas, porém o extrato obtido com o acetato de etila foi tóxico somente para as três concentrações mais baixas (50, 75 e 100 µg/mL). Analisando a viabilidade celular em ambos os extratos, nota-se que o etanólico expressou percentuais menores quando comparado ao extrato obtido com o acetato de etila e, isso pode estar relacionado com a maior quantidade de antioxidantes presentes neste extrato, conforme mostrado na Tabela 6, que pode ter desempenhado uma maior atividade antitumoral, diminuindo assim a viabilidade celular. Isso também pode ser observado nos outros tempos, em que os percentuais de viabilidade celular do extrato etanólico foram sempre menores que os observados para o extrato com o acetato de etila.

6 CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho mostraram bons rendimentos pela extração através do método de imersão com os solventes etanol e acetato de etila, com valores muito próximos aos valores encontrados na literatura. Além disso, foi possível recuperar os solventes utilizados no processo.

Do bagaço de uva, resíduo da indústria vinícola, foi possível obter extratos contendo potencial antioxidante, sendo que o extrato obtido com o solvente etanol apresentou uma maior concentração de antioxidantes do que o extrato com o acetato de etila.

Os resultados mostraram que ambos os extratos testados induziram uma proliferação das células HTC no tempo de 48 horas, possivelmente pelas vitaminas presentes em ambos dos extratos. Além disso, ambos os extratos demonstraram um potencial citotóxico para as células tumorais de fígado de rato no tempo de 72 horas, sendo que, para o extrato obtido com o acetato de etila somente as menores concentrações apresentaram citotoxicidade e, para o extrato etanólico todas as concentrações testadas foram tóxicas. Também se observou que os percentuais de viabilidade celular expressados pelo extrato etanólico foram menores do que os observados com o extrato com acetato de etila, visto que o extrato etanólico possui um maior potencial antioxidante.

Portanto, os dados indicam que os resíduos de indústria vinícola podem ser utilizados com um destino alternativo, associados a indústria farmacêutica, através da aplicação de ambos os extratos obtidos por meio do bagaço de uva orgânica, com atividade antitumoral.

REFERÊNCIAS

- ABE, L. T. et al. Compostos fenolico e capacidade antioxidante de uvas *Vitis labrusca* e *Vitis vinifera* L. **Ciência da Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 394-400, 2007.
- AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A. Biotecnologia industrial. São Paulo: **Editora Blucher**, v. 4, p. 523, 2001.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**. v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- BASTOS, V. D. Etanol, alcoolquímica e biorrefinarias. **BNDES Setorial**, n. 25, p. 5-38, 2007.
- BIASI, L.A.; DESCHAMPS, C. **Plantas aromáticas do cultivo à produção de óleo essencial**. Curitiba: Layer Studio Gráfico e Editora Ltda, 2009.
- BISCAIA, D. **Comparação entre tecnologia supercrítica e técnicas convencionais de extração para obtenção de extratos de própolis avaliados através de suas atividades biológicas**. Florianópolis: UFSC, 2007. 142 p. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.
- BONT, R. D.; LAREBEKE, N. V. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. **Mutagenesis**. v. 19, n. 3, p. 169-185, 2004.
- CAMARGO, U. A. **Porta-enxertos e cultivares de videira**. Bento Gonçalves: EMBRAPA Uva e Vinho, 2008.
- CAMPOS, L. M. A. S. de. **Obtenção de Extratos de Bagaço de Uva Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera*): parâmetros de processo e modelagem matemática**. Florianópolis: UFSC, 2005. 141 p. Tese (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.
- CASTRO, M. D. L.; GARCÍA-AYUSO, L. E. Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. **Analytica Chimica Acta**, v. 369, p. 1-10, 1998.
- CASTRO, M. D. L.; PRIEGO-CAPOTE, F. Soxhlet extraction: Past and present panacea. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 2383-2389, 2010.
- COLLIER, A. C.; PRITSOS, C. A. The mitochondrial uncouple dicumarol disrupts the MTT assay. **Biochemistry & Pharmacy**, v. 66, p. 281-287, 2003.
- COM - Committee on Mutagenicity of Chemicals in Food, Consumers Products, and the Environment. **Guidance on a strategy for genotoxicity testing of chemical**

substances. 71 p., 2011. Disponível em:
<<http://www.iacom.org.uk/guidstate/documents/COMGuidanceFINAL2.pdf>>. Acesso em: 16/05/2018.

DALMOLIN, I. A. L. **Uso de sementes de uva, um resíduo da agroindústria vinícola, empregando tecnologias supercríticas**. Campinas: UNICAMP, 2013. 170 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

DANCEY, C.; REIDY, J. **Estatística Sem Matemática para Psicologia: Usando SPSS para Windows**. Porto Alegre: Artmed, 2006.

DE FLORA, S.; FERGURSON, L. R. Overview of mechanisms of câncer chemopreventive agents. **Mutation Research**. v. 591, p. 8–15, 2005.

DÜSMAN, E. **Avaliação da ação citotóxica e mutagênica do iodo-131 e da acerola (*malpighia glabra* L.), e radioprotetora da fruta em relação ao radiofármaco, em doses diagnóstica e terapêutica, em tratamentos agudo e subcrônico, de ratos wistar**. Maringá: UEM, 2009. 223 p. Tese (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada, Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2009.

DÜSMAN, E. **Efeito do sistema de produção, da irradiação pós-colheita, do processamento e da estocagem, de sucos de *Vitis labrusca* L., na citotoxicidade e mutagenicidade, em células de HTC**. Maringá: UEM, 2014. 153 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada, Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2014.

EISENBRAND, G.; POOL-ZOBEL, B.; BAKER, V.; BALLS, M.; BLAAUBOER, B. J.; BOOBIS, A.; CARERE, A.; KEVEKORDES, S.; LHUGUENOT, J. C.; PIETERS, R.; KLEINER, J. Methods of in vitro toxicology. **Food and Chemical Toxicology**. v. 40, n. 2-3, p. 193–236, 2002.

EMBRAPA. **Cultivares de Uva e Porta-Enxertos de Alta Sanidade**. Embrapa Uva e Vinho. Brasília, DF, 2018. Disponível em: <https://www.embrapa.br/uva-e-vinho/cultivares-e-porta-enxertos/cultivares-de-dominio-publico/-/asset_publisher/rE0HjHq6jP8J/content/cultivar-isabel/1355300>. Acesso em: 10/11/2018.

FERREIRA, I. C. F. R.; ABREU, R.M.V. Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos. **Bioanálise**. v. 4, n. 2, p. 32-39, 2007.

FERREIRA, R. M. A.; FERNANDES, P. L. O.; FONTES, L. O.; RODRIGUES, A. P. M. S.; SILVA, L. T. Antioxidantes e sua importância na alimentação. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**. v. 5, n. 5, p. 26-30, 2010.

FIGUEIREDO FILHO, D. B.; SILVA JÚNIOR, J. A. da. Desvendando os mistérios do coeficiente de correlação de Person (r). **Política Hoje**. v. 18, n. 1, p. 115-146, 2009.

FREITAS, L. S. **Desenvolvimento de Procedimentos de Extração do Óleo de Semente de Uva e Caracterização Química dos Compostos Extraídos**. Porto Alegre: UFRGS, 2007. 227 p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

GOMES, J. P. M. **Pesquisa de atividade antitumoral e mutagênica *in vitro* de produtos naturais**. Araraquara: Unesp, 2008. 86 p. Tese (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

GESSNER, D. K.; RINGSEIS, R.; SIEBERS, M.; KELLER, J.; KLOSTER, J.; WEN, G.; EDER, K. Inhibition of the pro-inflammatory NF- κ B pathway by a grape seed and grape marc meal extract in intestinal epithelial cells. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, p. 1074-1083, 2011.

GRINDER-PEDERSON, L.; RASMUSSEN, S. E.; BUGEL, S.; JORGENSEN, L. V.; DRAGSTED, L. O.; GUBDERSEN, V.; SANDSTRÖM, B. Effect of diets based on foods from conventional versus organic production on intake and excretion of flavonoids and markers of antioxidative defense in humans. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 51, p. 5671-5676, 2003.

GRIGOLETTI, A.; SÔNEGO, O. R. **Principais doenças fúngicas da videira no Brasil**. Bento Gonçalves: EMBRAPA Uva e Vinho, 36 p, 1993.

GUÉANT, J. L.; CAILLEREZ-FOFOU, M.; BATTAGLIA-HSU, S.; ALBERTO, J. M.; FREUND, J. N.; DULLUC, I.; ADJALLA, C.; MAURY, F.; MERLE, C.; NICOLAS, J. P.; NAMOUR, F.; DAVAL, J. L. Molecular and cellular effects of vitamin B12 in brain, myocardium and liver through its role as co-factor of methionine synthase. **Biochimie**, v. 95, p. 1033-1040, 2013.

GUERRA, C. C. **Uva para processamento: pós colheita**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003.

HACCP – Hazard Analysis Critical Control Points. **Vitaminas**. 2018. Disponível em: <<http://www.segurancaalimentar.com/conteudos.php?id=556>>. Acesso em: 10/11/2018.

INCA – Instituto Nacional de Câncer. **Números de Câncer do Brasil**. Rio de Janeiro, RJ, 2016. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/wcm/dmdc/2016/numeros-cancer-brasil.asp>>. Acesso em: 12/05/2018.

INCA – Instituto Nacional de Câncer. **O que é câncer?**. Rio de Janeiro, RJ, 2018. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322>. Acesso em: 24/05/2018.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (São Paulo). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. Coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea - São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, p. 1020, 2008.

JIANG, Y.; ZHANG, X. Y.; SUN, L.; ZHANG, G. L.; DUERKSEN-HUGHES, P.; ZHU, X. Q.; YANG, J. Methyl methanesulfonate induces apoptosis in p53-deficient H1299 and Hep3B cells through a caspase 2- and mitochondria-associated pathway. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 34, n. 3, p. 694-704, 2012.

MARKOM, M.; HASAN, M.; DAUD, W. R.; SING, H.; JAHIM, J. M. Extraction of hydrolysable tannins from *Phyllanthus niruri* Linn.: Effects of solvents and extraction methods. **Separation and Purification Technology**, v. 52, p. 487-96, 2007.

MARTINS, I. M. **Biotransformação enzimática de resíduos de vinificação de uvas tinta e branca e seus efeitos antioxidante e anti-inflamatório *in vitro***. Campinas: Unicamp, 2016. 136 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

MAZZEO, D. E. C. **Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do BTEX, antes e após o processo de biorremediação por microrganismos, utilizando os sistemas teste de *Allium cepa* e cultura de células de mamífero**. Rio Claro: UNESP, 2009. 144 p. Tese (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Biologia Celular e Molecular, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2009.

MELECCHI, M. I. S. **Caracterização química de extratos de *Hibiscus tiliaceus* L: Estudo comparativo de métodos de extração**. Porto Alegre: UFRGS, 2005. Tese (Doutorado em Química), Instituto de Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

MELLO, L. M. R. de. Área de Produção de Uvas: panorama mundial. **Jornal da fruta**, v. 18, n.223, p. 8-9, 2010.

MELLO JÚNIOR, D. de C. **Produção de acetato de etila em biorrefinaria, uma análise de viabilidade**. São Paulo: EESP, 2010. 61 p. Tese (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Economia, Faculdade de Economia, Escola de Economia de São Paulo, São Paulo, 2010.

MORETTO, E.; FETT, R. **Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria alimentícia**. São Paulo: Livraria Varela, 1998.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MOURE, A.; CRUZ, J. M.; FRANCO, D.; DOMÍNGUEZ, J. M.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; NÚNEZ, M. J.; PARAJÓ, J. C. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, v. 72, p. 145-171, 2001.

OLIVEIRA, D. A. de. **Caracterização Fitoquímica e Biológica de Extratos Obtidos de Bagaço de Uva (*Vitis Vinifera*) das Variedades *Merlot* e *Syrah***. Florianópolis: UFSC, 2010. 211 p. Tese (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia

de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

PICADA, J.; KERN, A.; RAMOS, A. L. L. P.; SAFFI, J. O Estresse Oxidativo e as Defesas Antioxidantes. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003. p. 251-268.

PINELO, M.; ARNOUS, A.; MEYER, A. S. Upgrading of grape skins: significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, p. 579-590, 2006.

PINELO, M.; DEL FABBRO, P.; MANZOCCO, L.; NÚÑEZ, M. J.; NICOLI, M. C. Optimization of continuous phenol extraction from *Vitis vinifera* byproducts. **Food Chemistry**, v. 92, p. 109-117, 2005.

PLANTAR. **Uva Tercy ou Bordô**. Urussanga, SC, 2018. Disponível em: <<http://plantaragropecuaria.com.br/urussanga/?product=uva-tercy-ou-bordo>>. Acesso em: 10/11/2018.

PRADO, A. G. S. Química verde, os desafios do novo milênio. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 738-744, 2003.

PROTAS, J. F. da S.; CAMARGO, U. A.; MELLO, L. M. R. de. A Viticultura Brasileira: realidade e perspectiva. **Simpósio Mineiro de Viticultura e Enologia**. Andradas, v. 1, p. 17-32, 2002.

RABELLO-GAY, M. N.; RODRIGUES, M. A. R.; MONTELEONE-NETO, R. Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese: Métodos e Critérios de Avaliação. **Revista Brasileira de Genética**, 1991. p.75-82.

REBELLO, J. de M. **Avaliação da atividade antioxidante e antifúngica de análogos sintéticos da acetofenona e pró-oxidante e antitumoral de Chalconas sintéticas**. Florianópolis: UFSC, 2005. 130 p. Tese (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Faculdade de Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

REIS, P. E. D. dos; RODRIGUES, C. C.; VASQUES, C. I.; CARVALHO, E. C. de. Efeitos adversos identificados em local de infusão intravenosa periférica por drogas quimioterápicas. **Ciência y Enfermería**. Concepción, v. 14, n. 2, p. 55-64, 2008.

ROMBALDI, C. V.; BERGAMASQUI, M.; LUCCHETTA, L.; ZANUZO, M.; SILVA, J. A. Produtividade e qualidade de uva, CV. Isabel, em dois sistemas de produção. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 26, n. 1, p. 89-91, 2004.

RIZZON, L. A.; LINK, M. Composição do suco de uva caseiro de diferentes cultivares. **Ciência Rural**, v. 36, p. 689-692, 2006.

RIZZON, L. A.; MANFROI, V.; MENEGUZZO, J. Elaboração de suco de uva na propriedade vitícola. Bento Gonçalves: **Embrapa Uva e Vinho**, p. 24, 1998.

RIZZON, L. A.; MENEGUZZO, J. Suco de uva. Brasília, DF: **Embrapa Informação Tecnológica**, p. 45, 2007.

RIZZON, L. A.; MIELE, A. Analytical characteristics and discrimination of Brazilian commercial grape juice, nectar, and beverage. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 32, p. 93-97, 2012.

ROCK, C. L.; JACOB, R. A.; BOWEN, P. E. Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrients: Vitamin C, vitamin E, and the carotenoids. **Journal of the American Dietetic Association**. v. 96, n. 7, p. 693-702, 1996.

ROCKENBACH, I. I.; SILVA, G. L. da; RODRIGUES, E.; KUSKOSKI, E. M.; FETT, R. Influência do Solvente no Conteúdo Total de Polifenóis, Antocianinas e Atividade Antioxidante de Extratos de Bagaço de Uva (*Vitis vinifera*) Variedades *Tannat* e *Ancelota*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 238-244, 2008.

SALES, N. F. F. de. **Bioatividade de Resíduos da Vitivinicultura em Linhagem de Células de Hepatocarcinoma Humano**. Rio de Janeiro: UFRJ, 2013. 95 p. Tese (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Faculdade de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

SANCHÉZ, C. M. **Polyphenolic fractions from wine by-products as potential antitumoral and/or protective agents UV damage**. Barcelona: UB, 2006. 162 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biomedicina, Faculdade de Biomedicina, Universidade de Barcelona, Barcelona, 2006.

SHAHIDI, F. **Bailey's Industrial Oils and Fat Products**. 6^aed. New York: John Wiley & Sons, p. 465-490, 2005.

SIKORA, E.; CIESLIK, E.; LESZCZYNSKA, T.; FILIPIAK-FLORKIWUACZ, A.; PISULEWSKI, P. M. The antioxidant activity of selected cruciferous vegetables subjected to aquathermal processing. **Food Chemistry**. v. 107, n. 1, p. 50-55, 2008.

SOUQUET, J. M.; CHEYNIER, V.; BROSSAUD, F.; MOUTOUNET, M. Polymeric proanthocyanidins from grape skins. **Phytochemistry**, v. 43, n. 2, p. 509-512, 1996.

SOUZA, A. V.; GOMES, G. P.; VIEIRA, M. R. S.; VIEITES, R. L.; LIMA, G. P. P. Avaliação de antioxidantes em casca de *Vitis* sp. **Revista Alimentus**, n. 2, p. 1-9, 2012.

SUN, T.; CHEN, Q. Y.; WU, L. J.; YAO, X. M.; SUN, X. J. Antitumor and antimetastatic activities of grape skin polyphenols in a murine model of breast cancer. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 3462-3467, 2012.

SUNDRAM, F. X. Radionuclide therapy of hepatocellular carcinoma. **Biomedical Imaging and Intervention Journal**. v. 2, n. 3, e. 40, 2006.

TAKAHASHI, C. S. Testes citogenéticos in vitro e aneuploidia. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ed. ULBRA, 2003. p. 151-168.

TELESIL, M.; MACHADO, F. A. A influência do exercício físico e dos sistemas antioxidantes na formação de radicais livres no organismo humano. **SaBios: Revista de Saúde & Biologia**, v. 3, n. 1, p. 40-49, 2008.

VEDANA, M. I. S.; ZIEMER, C.; MIGUEL, O. B.; PORTELLA, A. C.; CANDIDO, L. M. B. Efeito do processamento da atividade antioxidante de uva. **Journal of Food and Nutrition**, v. 19, n. 2, p. 159, 2008.

VIEIRA, A. C. P.; WATANABE, M.; BRUCH, K. L. Perspectiva de Desenvolvimento da Vitivinicultura em Face do Reconhecimento da Indicação de Procedência Vales da Uva Goethe. **Revista Gestão, Inovação e Tecnologias**, v. 2, n. 4, p. 327-343, 2012.

WANG, J.; CAO, H.; XUE, X.; FAN, C.; FANG, F.; ZHOU, J.; ZHANG, Y.; ZHANG, X. Effect of vitamin C on growth of caprine spermatogonial stem cells *in vitro*. **Theriogenology**, v. 81, p. 545-555, 2014.

WILLIAMS, R. J.; SPENCER, J. P.; RICE-EVANS, C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? **Free Radical Biology Medicine**, v. 36, n. 7, p. 838-49, 2004.