



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

REBECA CAVALCANTI RIBEIRO IMBROINISE

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS E SISTEMAS
CARREADORES A PARTIR DE VARIEDADES DE *Vitis vinifera***

Salvador

2018

REBECA CAVALCANTI RIBEIRO IMBROINISE

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS E
SISTEMAS CARREADORES A PARTIR DE VARIEDADES DE *Vitis vinífera***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Lidércia C. R. Cavalcanti e Silva

Coorientadora: Alessandra Guedes

Salvador

2018

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA), com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

CAVALCANTI RIBEIRO IMBROINISE, REBECA
Avaliação Do Potencial Antioxidante Dos Extratos E Sistemas Carreadores A Partir De Variedades De *Vitis vinífera* / REBECA CAVALCANTI RIBEIRO IMBROINISE. -- Salvador, 2018.

98 f. : il

Orientadora: Lidercia Cavalcanti R. C. e Silva.

Coorientador: Alessandra Guedes.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia) -- Universidade Federal da Bahia, UFBA, 2018.

1. Antioxidante. 2. Uvas. 3. Sistemas Carreadores. 4. Compostos Fenólicos. I. Cavalcanti R. C. e Silva, Lidercia. II. Guedes, Alessandra. III. Título.

REBECA CAVALCANTI RIBEIRO IMBROINISE

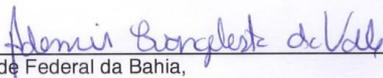
“Avaliação do Potencial Antioxidante de Extratos Concentrados de Frutos de *Vitis Vinifera* e Sistemas Carreadores Aditivados com estes Extratos”

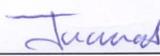
Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia pelo Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

Aprovada em 05 de março de 2018.

BANCA EXAMINADORA:

Lidércia Cavalcanti Ribeiro Cerqueira e Silva – Orientadora 
Doutora em Química pela Universidade Federal da Bahia,
UFBA, Brasil.
Universidade Federal da Bahia.

Ademir Evangelista do Vale 
Doutor em Química pela Universidade Federal da Bahia,
UFBA, Brasil.
Universidade Federal da Bahia

Jorge Clarêncio Souza Andrade 
Doutor em Patologia Experimental pelo Instituto Oswaldo Cruz,
IOC, Brasil.
Fundação Oswaldo Cruz..

DEDICATÓRIA

*Dedico esse trabalho à minha família e à todos
que acreditaram em mim. Sou eternamente grata a vocês
por toda a compreensão, preocupação, incentivo, apoio e amor*

Muito Obrigada por tudo!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, por toda benção e graça concedida em minha vida, sem ELE nada somos.

À minha família que sempre me apoiou em todas as etapas deste processo, me incentivando e me acolhendo sempre que preciso, Pai, Mãe, Raffa (fifó), Martinha, Vovó e Rosália, meu muitíssimo obrigada por todo amor transmitido em forma de carinho e cuidado. Esse título também é de vocês!! Amo vocês Incondicionalmente!

À minha orientadora, tia, madrinha, Lidércia Cavalcanti, serei eternamente agradecida por ter me proporcionado esta oportunidade de crescimento pessoal e profissional. Muito Obrigada!

Agradeço à Milleno, grande professor e colega de projeto. Muitíssimo obrigada por todo ensinamento e paciência.

À Neilson, que por tantas vezes me auxiliou não somente nos experimentos, mas também emocionalmente, e me mostrando que tudo dá certo no final.

Aos alunos de Iniciação Científica, os quais foram meu braço direito em todo projeto. Mutíssimo obrigada à Ana, Ridalva, Nathalie, mas principalmente à Fábio, Laila e Daniel. Cada passo que dei sei que foi com o auxílio de vocês, muito obrigada.

Ao Professor Ademir, por todo apoio em seu laboratório e por todo ensinamento.

Ao Professor Jorge Clarêncio, por toda disponibilidade, carinho e amizade de sempre. Muito Obrigada por dividir comigo esse momento tão esperado!

Agradeço aos colegas do PPG que se tornaram hoje meus amigos: Márcio, Kizzes e em especial Priscila e Valéria. Muito obrigada por tudo.

Ao amigo Cleiton Carneiro, por todo apoio e auxílio!

Ao Professor Antônio Menezes, por ceder gentilmente o laboratório para a realização deste projeto

Aos amigos do laboratório de toxicologia, Nathalia, Juliana, Ynayara, Erival, Matheus, Ana Laura e Sérgio, gratidão por todo apoio e toda amizade! Vocês são maravilhosos e já fazem parte de minha vida!

À Jota, obrigada por tudo! Por todas as explicações, incentivos, leituras do ELISA e sorrisos!

Agradeço imensamente à todos os colegas da Faculdade de Farmácia (FacFAR), todos que de alguma forma me proporcionaram a realização deste sonho: Jorge, Tamires, Leonardo Maciel e Cesar.

Aos grandes amigos externos do mestrado, que sempre acreditaram nesse sonho: Isis, Nathália, Rodrigo, Nana, Cau, Shelle, Laura, Beto, Amo vocês e obrigada por toda paciência comigo durante esse processo.

A todos os professores do Programa de Pós- Graduação em Biotecnologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, que colaboraram para minha formação acadêmica e profissional.

À XEROX ADM, pelo apoio e amizade.

A CAPES, q pela colaboração científica e financeira, apoiando às atividades acadêmicas e o desenvolvimento de profissionais cada vez mais capacitados.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão deste trabalho. Muito Obrigada

RESUMO

Os flavonóides são considerados excelentes antioxidantes, capazes de interagir com espécies reativas de oxigênio com grande eficiência. Vários são os métodos para testar a atividade antioxidante, podendo ser usados para compostos isolados e extratos. Diversos estudos têm demonstrado que a *Vitis vinífera* é fonte natural de antioxidantes e rica em compostos fenólicos. O objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial antioxidante de extratos concentrados de frutos de *Vitis vinífera* e de suco de uva integral em sistemas carreadores aditivados. Como objetivos secundários foram incluídos: O preparo de sistemas carreadores à base dos extratos concentrados obtidos. Além disso, comparar a atividade antioxidante dos extratos concentrados nos sistemas carreadores, avaliar suas características físico-químicas e a estabilidade dos sistemas carreadores. Foram preparados extratos a partir das amostras e analisados o melhor método de extração desses frutos, avaliando a partir de espectrofotômetro qual metodologia apresentou maiores concentrações de fenólicos totais e flavonoides. De acordo com os resultados obtidos a amostra obtida através do método de rotaevaporação exibiu maiores concentrações de fenólicos totais e flavonoides, e após análise do sequestro de radicais livres, observou-se que a amostra de *Vitis vinífera in natura* apresentou maiores atividades antioxidantes quando comparada com o suco de uva integral. Ainda obteve-se como resultado que a utilização de um complexo carreador não promoveu estatisticamente um maior potencial antioxidante.

Palavras chave: Antioxidante, Uva, DPPH, Compostos fenólicos

ABSTRACT

Flavonoids are considered excellent antioxidants, capable of interacting with reactive oxygen species with great efficiency. Several methods are used to test the antioxidant activity and can be used for isolated compounds and extracts. Several studies have shown that *Vitis vinifera* is a natural source of antioxidants and rich in phenolic compounds. The objective of this work was to evaluate the antioxidant potential of concentrated fruit extracts of *Vitis vinifera* and of integral grape juice in additive carrier systems. As secondary objectives were included: The preparation of carrier systems based on the concentrated extracts obtained. In addition, to compare the antioxidant activity of the concentrated extracts in the carrier systems, to evaluate its physical-chemical characteristics and the stability of the carrier systems. Extracts were prepared from the samples and the best method of extracting these fruits was analyzed, evaluating from the spectrophotometer which methodology presented higher concentrations of total phenolics and flavonoids. According to the results obtained the sample obtained by the method of rotaevaporation exhibited higher concentrations of total phenolics and flavonoids, and after analysis of the free radical sequestration, it was observed that the sample of *Vitis vinifera* in natura presented higher antioxidant activities when compared with the whole grape juice. It was still obtained as a result that the use of a carrier complex did not statistically promote a higher antioxidant potential.

Key words: Antioxidant, Grape, DPPH, Phenolic compounds

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Esquematização das camadas principais da pele: epiderme, derme e hipoderme. (Fonte: BEAR, M.F; CONNORS, B,W.; PARADISO, M.A., 2002);.	20
Figura 2	Diferença estrutural da molécula estável para uma molécula instável (Fonte: BACHTOLD, 2013);	24
Figura 3	Estrutura das principais classes dos Flavonóides Fonte: (CERQUEIRA et al., 2007);	29
Figura 4	Modelo do sistema de plantio de videiras (Fonte: IBRAVIN (Instituto Brasileiro do Vinho);	31
Figura 5	Mecanismos de reação entre o radical DPPH e um antioxidante através da transferência de um átomo de hidrogênio (Fonte: REZENDE 2010);	32
Figura 6	Representação da reação da atividade antioxidante pelo método do DPPH (Fonte: Modificado de VEDANA, 2008);	33
Figura 7	Escala comparativa entre o mundo nano e o macro. Comparação entre o tamanho do menor átomo, o H, ao tamanho do planeta Terra (Fonte: RESENDE, 2016);	35
Figura 8	Estrutura química da ciclodextrina. Estas possuem superfícies polares e hidrofílicas e uma região central apolar e hidrofóbica (Fonte: adaptado de SOUZA, 2016; ZHOU; RITTER 2010);	38
Figura 9	Fluxograma das etapas metodológicas realizadas;	40
Figura 10	Descrição dos reagentes utilizados durante o desenvolvimento do projeto exposto	41
Figura 11	Representação do modelo do liofilizador utilizado para o processo de produção de amostras secas;	44
Figura 12	Representação do modelo do Evaporador Rotatório utilizado para o processo de produção dos extratos;	47
Figura 13	Representação do modelo do aparelho de <i>Spray Dryer</i> utilizado para secagem por atomização;	48
Figura 14	Fórmula da absorbância calculada após o método do DPPH* (Fonte: NASCIMENTO <i>et al.</i> , 2011);	54

Figura 15	Curva de calibração de Ácido Gálico;	62
Figura 16	Curva de Calibração da Quercetina;	65
Figura 17	Curva de calibração de Ácido Gálico com o complexo de encapsulação (Ciclodextrina);	68
Figura 18	Curva de calibração da Quercetina com o complexo de encapsulação (ciclodextrina);	70
Figura 19	Resultado da análise da atividade antioxidante da amostra de uva in natura com e sem a ciclodextrina após 30 minutos de reação;	73
Figura 20	Resultado da análise da atividade antioxidante da amostra de suco de uva integral industrializado com e sem a ciclodextrina após 30 minutos de reação;	75
Figura 21	Resultado da análise da atividade antioxidante do padrão BHT com e sem a ciclodextrina após 30 minutos de reação;	76
Figura 22	Valores do IC 50 das amostras após 30 minutos de leitura;	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Avaliação de estabilidade das amostras de uva vitoria e suco (temperatura ambiente) – pH;	56
Tabela 2	Avaliação de estabilidade das amostras de uva vitoria e suco (temperatura ambiente) - características organolépticas;	57
Tabela 3	Avaliação de estabilidade das amostras de uva vitoria e suco (geladeira)- pH;	58
Tabela 4	Avaliação de estabilidade das amostras de uva vitoria e suco (geladeira)- características organolépticas;	58
Tabela 5	Resultado da quantificação do teor de fenólicos totais das amostras de uva in natura e suco de uva integral industrializado em seus diferentes tipos de metodologia de extração;	62
Tabela 6	Resultado da quantificação do teor de flavonóides das amostras de uva in natura e suco de uva integral industrializado em seus diferentes tipos de metodologia de extração;	66
Tabela 7	Resultado da quantificação do teor de fenólicos totais das amostras de uva in natura e suco de uva integral industrializado após incorporação do sistema carreador (ciclodextrina);	69
Tabela 8	Resultado da quantificação do teor de flavonóides das amostras de uva in natura e suco de uva integral industrializado após incorporação do sistema carreador (ciclodextrina);	71

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	16
2.	OBJETIVOS	18
2.1	OBJETIVO GERAL	18
2.1.1	Objetivos específicos	18
3.	JUSTIFICATIVA	19
4.	REFERENCIAL TEÓRICO	20
4.1	PELE	20
4.1.1	Envelhecimento cutâneo	22
4.2	RADICAIS LIVRES	23
4.3	ANTIOXIDANTES	25
4.4	COMPOSTOS FENÓLICOS	26
4.4.1	Compostos fenólicos da uva	28
4.5	ENSAIOS DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE ATRAVÉS DO TESTE DE DPPH	31
4.6	NANOTECNOLOGIA	34
4.6.1	Sistemas carreadores	36
4.6.2	Ciclodextrina	38
5.	METODOLOGIA	40
5.1	LOCAIS DE DESENVOLVIMENTO	40
5.2	EQUIPAMENTOS	41
5.3	REAGENTES	41
5.4	AMOSTRAS	42
5.4.1	Preparo das amostras de uva e suco de uva industrializado integral	43
5.4.2	Liofilização de amostras	43

5.4.3	Maceração dos extratos	45
5.4.4	Secagem por atomização ou <i>Spray Dryer</i>	46
5.4.5	Concentração dos extratos	47
5.5	AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E ESTABILIDADE	49
5.5.1	<i>Avaliação das características físico-químicas e organolépticas</i>	49
5.6	OTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO DE BIOATIVOS ANTIOXIDANTES	50
5.6.1	Quantificação do teor de fenólicos totais	50
5.6.2	Quantificação do teor de flavonóides	51
5.7	ENCAPSULAÇÃO DO ATIVO NA CICLODEXTRINA – SISTEMA CARREADOR	52
5.8	ANÁLISE DOS COMPOSTOS FENÓLICOS ENCAPSULADOS	52
5.9	ENSAIOS DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE ATRAVÉS DO TESTE DE DPPH	53
5.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	54
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
6.1	AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E ESTABILIDADE	55
6.2	OTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO DE BIOATIVOS ANTIOXIDANTES	61
6.2.1	Fenólicos totais	61
6.2.2	Flavonóides	64
6.3	RESULTADOS DA OTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO DE BIOATIVOS ANTIOXIDANTES E INCORPORAÇÃO COM CICLODEXTRINA	67
6.3.1	Fenólicos totais e flavonóides	67

6.4	ENSAIO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE COM A CICLODEXTRINA	72
6.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	79
7.	CONCLUSÃO	80
8.	REFERÊNCIAS	82

1. INTRODUÇÃO

A uva é uma das frutas mais cultivadas no mundo com aproximadamente 75 milhões de toneladas em 2014 (FAOSTAT, 2014). No Brasil, há predominância do cultivo de uvas da espécie *Vitis vinífera* para elaboração de vinhos finos e da espécie *Vitis labrusca*, caracterizada pelas uvas americanas e híbridas utilizadas na elaboração tanto de vinhos de mesa e sucos quanto para o consumo *in natura*. Estima-se que cerca de 80% das uvas produzidas é destinada a fabricação de vinhos. Neste processo de industrialização são gerados resíduos líquidos e sólidos (RIBEIRO, 2016).

A uva pode conter diferentes substâncias bioativas, como os flavonoides (flavanois, flavonois, flavonas, antocianidinas, entre outros) e os compostos de natureza não flavonoide (ácidos fenólicos, benzoicos, cinâmicos e estilbenos), os quais permanecem no resíduo devido a sua extração incompleta durante o processamento. Apesar disso, boa parte do resíduo da uva ainda é utilizado como adubo ou na alimentação animal (RIBEIRO, 2016).

Os bioativos presentes na uva, não estão somente relacionados aos fenólicos, mas também, estão associados aos ácidos graxos poli-insaturados presentes nas sementes, como os ácidos linoleico e linolênico que são essenciais visto que não podem ser sintetizados pelo organismo humano. Além disso, os compostos bioativos podem apresentar diversas atividades biológicas, tais como atividade antioxidante, capacidade de sequestrar espécies reativas de oxigênio, capacidade de sequestrar eletrólitos, capacidade de quelar metais e capacidade de modular a atividade de algumas enzimas celulares (MELO, 2011).

Desta forma, essas substâncias podem proteger os constituintes celulares e limitar o risco de desenvolvimento de doenças associadas ao estresse oxidativo tecidual e nos sítios de inflamação em certas doenças, como por exemplo, a artrite reumatoide. Existem estudos sobre a composição e determinação de compostos bioativos da uva, entretanto, são pesquisas relacionadas às frações separadas do bagaço de uva constituído por cascas, sementes e polpa (BOUTERFAS *et al.*, 2016).

Alguns frutos possuem uma gama de compostos bioativos vegetais. Estes apresentam grande atividade antioxidante, moléculas como: carotenóides,

flavonóides, ácidos cinâmicos, ácidos benzóicos, ácido fólico, ácido ascórbico, tocoferóis, tocotrienóis, terpenóides, alcalóides e polifenóis são naturalmente sintetizadas pelas plantas e possuem alto poder antioxidativo (GHASEMZADEH, JAAFAR e RAHMAT, 2010). Apesar da existência de vários agente antioxidantes sintéticos, seu consumo a longo prazo pode gerar problemas indesejados a saúde (BOUTERFAS *et al.*, 2016). Portanto, a necessidade de substâncias naturais, seguras e de baixo custo, faz das plantas organismos de grande interesse para a indústria farmacêutica, cosmética, alimentícia, dentre outras. Ainda há poucos estudos que contemplem as características físicas e químicas, o perfil dos compostos fenólicos remanescentes e o potencial antioxidante da uva em sua totalidade, considerando todo o resíduo gerado pela indústria.

Com base no exposto, este trabalho teve como objetivo, avaliar a atividade antioxidante das uvas das espécie *Vitis vinífera* da variedade Vitória e do Suco de uva Integral contendo um mix de uvas da espécie *Vitis Vinífera* das variedade Isabel e Bordô. As amostras foram associadas à sistemas carreadores objetivando uma maior estabilidade e maiores resultados no teor de compostos fenólicos e uma maior redução de radicais livres.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial antioxidante de extratos de frutos de *Vitis vinifera* e sistemas carreadores aditivados.

2.1.1 *Objetivos Específicos*

Preparar extratos a partir dos frutos da *Vitis vinifera* e do Suco de Uva Integral Industrializado

Avaliar as características físico-químicas e estabilidade dos extratos.

Otimizar a metodologia de extração de bioativos antioxidantes

Quantificar o teor de Fenólicos Totais nos extratos.

Quantificar o teor de Flavonóides nos extratos.

Preparar os sistemas carreadores à base dos extratos concentrados obtidos.

Avaliar e comparar a atividade antioxidante dos extratos concentrados nos sistemas carreadores.

3. Justificativa

O interesse por substâncias que tenham efeito antioxidante comprovado provém do fato que essas substâncias geralmente apresentem ação antienvhecimento, uma vez que protegem o tecido cutâneo de agressões geradas por radicais livres. Algumas plantas medicinais e frutos constituem uma importante fonte de recursos terapêuticos, conforme atestam diversos medicamentos provenientes de substâncias de origem vegetal ou inspirados em seus componentes (CASANOVA *et al.*, 2017).

O uso de sistemas nanotecnológicos como forma de veicular ativos dermocosméticos podem contribuir para uma melhor liberação e estabilidade desses ativos, melhorando assim os benefícios de tratamento inovadores para a saúde.

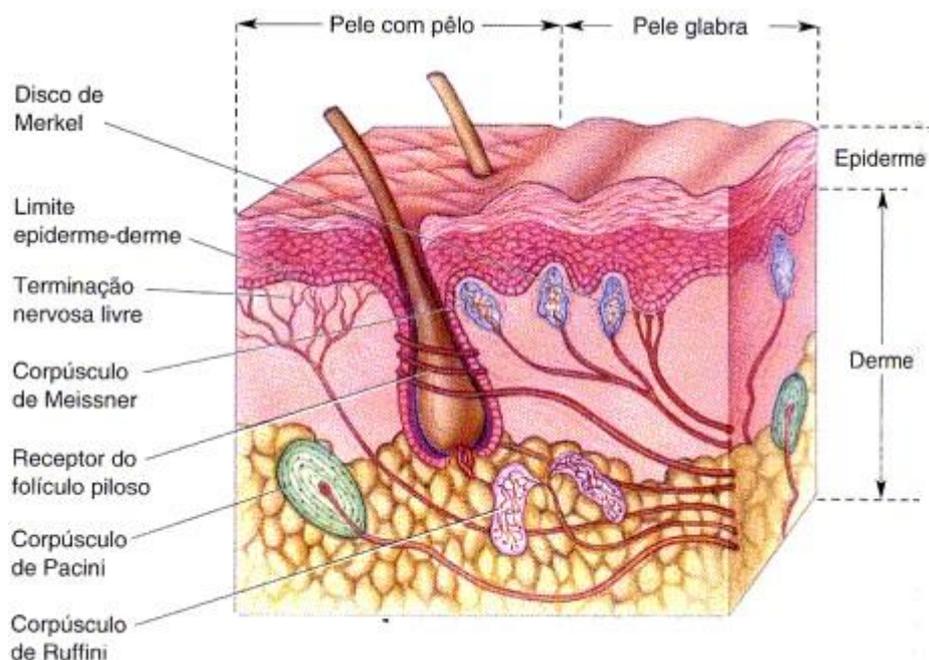
A combinação de substâncias ativas mostra-se particularmente promissora no tratamento de doenças complexas, pois permite a atuação simultânea sobre diversos alvos, garantindo maior eficácia e menor chance de resistência aos fármacos empregados. Nesse contexto as plantas medicinais e seus metabólitos têm sido objeto de crescente interesse. Suas interações farmacológicas, que podem ser observadas tanto entre componentes de extratos vegetais quanto entre produtos naturais e fármacos sintéticos, apresentam significativo potencial terapêutico (CASANOVA *et al.*, 2017). Entretanto, são necessários métodos de estudo adequados para compreendê-las.

4. Referencial Teórico

4.1 PELE

A pele é o órgão mais extenso do corpo humano, correspondendo a aproximadamente 15% do peso corporal e 1,80 m² em um adulto de porte médio (SIMON, 2013). Este órgão reveste e protege o organismo, exercendo funções como termorregulação e controle hemodinâmico, além de síntese e excreção de metabólitos como vitaminas e hormônios (AZULAY, 2011). Estruturalmente, a pele é composta por três localizações principais: a hipoderme composta pelo tecido subcutâneo ou adiposo, a derme sobrejacente composta pelo tecido conjuntivo frouxo e pelo tecido conjuntivo denso não modelado, e a epiderme, camada superficial composta pelo tecido epitelial (ANISSIMOV *et al.*, 2013). (FIGURA 1).

Figura 1. Esquemática das camadas principais da pele: epiderme, derme e hipoderme.



Fonte: (BEAR, M.F; CONNORS, B,W.; PARADISO, M.A. 2002)

A epiderme, com uma espessura média de 1,00 a 4,00 mm é, por sua vez, subdividida em quatro camadas: basal, espinhal, granulosa e por fim, a camada córnea, considerada o verdadeiro limite entre o organismo e o meio exterior (DRÉNO, 2008). Segundo Ribeiro (2006), a pele possui diversas funções tais como: proteção contra agentes físicos, químicos e biológicos do ambiente (relativamente impermeável); regulação de temperatura; excreção; sensibilidade tátil; produção de vitamina D. Ainda segundo Ribeiro (2006) Também a cor da pele varia em relação com a raça, idade, sexo e regiões corporais, dependendo predominantemente da quantidade de pigmentos (melanina, oxi-hemoglobina, hemoglobina reduzida, melanóide, carotenos) existentes.

De acordo com Spencer (1991) a derme é uma camada de tecido conjuntivo fibroso irregular, com função de nutrir e proteger o corpo contra lesões mecânicas. O seu desenvolvimento se dá a partir da mesoderme embrionária, assim como os músculos e o esqueleto. Contém algumas fibras elásticas e reticulares, assim como muitas fibras colágenas, e é bem suprida por vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos. As fibras elásticas mantêm a elasticidade da pele, são imprescindíveis à correta manutenção do tegumento e formam uma espessa e sólida rede na derme profunda. Possui um tempo de vida de cerca de 180 dias e é degradada pela enzima elastase. Já as reticulares se localizam principalmente ao redor de glândulas, folículos do pêlo e agrupados na região subepidérmica, aumentando de tamanho e sendo mais desenvolvidas quando há intensa atividade fibroblástica, como por exemplo, na sarcoidose, tuberculose e tumores.

Já a camada papilar é considerada como a mais superficial e caracteriza-se por possuir fibroblastos, fibras colágenas, fibras elásticas, mastócitos e macrófagos. Esta camada recebe esse nome por causa de suas numerosas papilas que se projetam na região dérmica. Estende-se pouco abaixo das bases da papila, onde se liga à camada reticular. Inúmeras dessas papilas contêm alças capilares e outras possuem receptores sensoriais especializados que reagem a estímulos externos, como mudanças da temperatura e pressão (SPENCER, 1991; DI DIO et al., 2002; GUIRRO, 2004).

Boigly (1986) e Spencer (1991), delineiam que a hipoderme pode ser descrita como a última camada da pele e se localiza entre a camada tendiniforme da derme e as superfícies aponeuróticas dos órgãos subjacentes. É também chamado de tecido

subcutâneo ou fáscia superficial. Forma-se através de um tecido conjuntivo frouxo, frequentemente tendo células adiposas colocadas entre as fibras. Em alguns locais como no abdome e nas nádegas, o acúmulo de gordura no tecido subcutâneo pode ser muito amplo. Supri-se de vasos sanguíneos e terminações nervosas.

4.1.1 Envelhecimento Cutâneo

O envelhecimento pode ser caracterizado pelo conjunto de alterações inevitáveis que ocorrem progressivamente em nosso organismo ao longo de nossas vidas. É um processo biológico complexo, contínuo que se caracteriza por alterações celulares e moleculares, com diminuição progressiva da capacidade de homeostase do organismo, senescência e/ou morte celular (DE PAULA *et al.*, 2016). Existem dois processos que podem ocasioná-lo: o envelhecimento intrínseco, processo biológico que acontece ao longo do tempo, algo inevitável, porém estudos revelam que este processo pode ser modulado com manipulações relacionadas com o envelhecimento e o envelhecimento extrínseco, que ocorre por acúmulos de danos ao DNA, causados por exposições excessivas aos raios solares ultravioletas e fatores ambientais como poluição, fumo, consumo excessivo de álcool e estresse. (DE PAULA *et al.*, 2016).

Segundo BORGES (2006), desde que nascemos o envelhecimento é um processo natural, porém após a terceira idade o processo fica em maior evidência. A qualidade de vida a qual o organismo foi submetido relaciona-se diretamente com o envelhecimento. O envelhecimento é um dos temas de maior relevância na medicina atual, tendo em vista o aumento da expectativa de vida da população e, ao mesmo tempo, a procura de formas para retardá-lo (BECHELLI *et al.*, 2016). Quando se descreve especificamente em envelhecimento cutâneo, reconhecemos o sol como o fator ambiental mais relevante, através da ação oxidativa das radiações solares, particularmente da radiação UVA. (BECHELLI *et al.*, 2016).

Na área dermatológica, reconhece-se que a preocupação com o bem-estar físico, associado a aparência jovem e saudável, é solicitação frequente dos pacientes nos consultórios dermatológicos. O entendimento dos fenômenos envolvidos com o

envelhecimento, assim como ações que visem a sua prevenção e seu tratamento, constitui capítulos essenciais na prática dermatológica moderna (SCHALKA *et al.*, 2016).

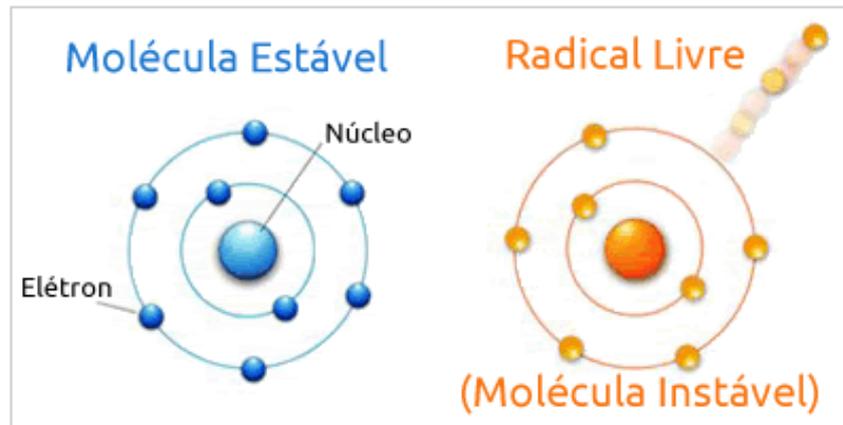
Mais recentemente, entretanto, a ciência tem procurado avaliar outros fatores ambientais, além da radiação solar, que possam contribuir para o aceleração do processo de envelhecimento cutâneo extrínseco (BECHELLI *et al.*, 2016). Os eventos relacionados ao envelhecimento cronológico (intrínseco) e, principalmente, o fotoenvelhecimento são mais bem conhecidos e estudados. O uso diário de medidas de fotoproteção, particularmente o uso de protetores solares, é reconhecido por todos como medida essencial em um programa de prevenção do envelhecimento. A geração de espécies reativas de oxigênio é comum a todos. Assim, cresce o desenvolvimento de produtos cosmecêuticos que contenham ativos antioxidantes específicos visando a retardar o envelhecimento cutâneo. (SCHALKA *et al.*, 2016).

A vida moderna, particularmente nos centros urbanos, propõe um estilo de vida bastante diferente do passado, com exposição a novos fatores ambientais como a poluição, tabaco, alimentação inadequada, estresse emocional, sono irregular e ritmo de vida acelerado (DE PAULA *et al.*, 2016).

4.2. RADICAIS LIVRES

Os radicais livres são átomos ou moléculas produzidas de maneira contínua durante os processos metabólicos e atuam como mediadores para a transferência de elétrons em várias reações bioquímicas, desempenhando funções importantes no metabolismo (CAMPOS, 2011). A Figura 2 representa de forma simplificada o que ocorre com uma molécula estável (azul) ao perder um elétron. A molécula torna-se um radical livre (em laranja), ficando altamente reativa e instável.

Figura 2. Diferença estrutural da molécula estável para uma molécula instável.



Fonte: BÄCHTOLD, 2013

A teoria dos radicais livres é atualmente a mais aceita na tentativa de explicar o processo de envelhecimento da pele (RUIVO, 2014). Tal teoria é atribuída a Denham Harman que, em 1956, fundou-se na observação de que a irradiação em seres vivos levava à indução da formação de radicais livres, os quais diminuía o tempo de vida desses seres e geravam modificações semelhantes ao envelhecimento. De acordo com esta teoria, o lento desenvolvimento de danos celulares irreversíveis leva ao envelhecimento (GOUVEIA *et al*, 2016).

A geração de radicais livres é um processo contínuo e fisiológico podendo ocorrer no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana celular de proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA, que possui funções biologicamente relevantes (FRANZEN *et al*, 2013). Alguns radicais livres de importância biológica podem ser agrupados junto a espécies químicas não radicalares, sob a denominação *Espécies Reativas*, termo utilizado para designar espécies químicas radicalares ou não radicalares. (WINTERBOURN, 2008 apud FORMAN *et al*, 2015).

Estas espécies químicas são denominadas Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), quando provenientes da redução do oxigênio (como o radical hidroxila, o ânion radical superóxido, o peróxido de hidrogênio, etc.) e Espécies Reativas de Nitrogênio (ERN), quando derivadas do óxido nítrico (SANTO, 2016).

As principais fontes exógenas de radicais livres são alimentos ricos em gordura, álcool, fumo, radiação ultravioleta e o estresse, que produzem assim um aumento de catecolaminas. Quando ocorre a formação de radicais livres em excesso provoca um desequilíbrio no balanço entre o processo oxidativo e o antioxidativo natural, ocorrerá um estresse oxidativo (KEDE, E SABATOVICH, 2009). O estresse oxidativo decorre de uma instabilidade entre a geração de compostos oxidantes e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante. A geração de radicais livres ou espécies reativas não radicais é resultante do metabolismo de oxigênio. O sistema de defesa antioxidante tem a função de impossibilitar ou limitar os danos causados pela ação prejudicial dos radicais livres ou espécies reativas de não radicais. (COQUEIRO *et al.*, 2017).

4.3. ANTIOXIDANTES

Antioxidante é a substância que retarda o aparecimento de alteração oxidativa (MELO; BOAS, 2010). Consideram-se como antioxidantes certas substâncias presentes de forma natural ou adicionadas intencionalmente às gorduras ou aos alimentos para retardar o aparecimento dos fenômenos de oxidação, mantendo intactas suas características sensoriais (SANTOS *et al.*, 2010). A grande preocupação em estudar substâncias antioxidantes vem, em detrimento dos efeitos maléficos que os radicais livres geram ao organismo. O fato de a oxidação ser importantíssima à vida aeróbica faz com que os radicais livres sejam produzidos naturalmente. Os radicais livres gerados *in vivo* estão envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas de grande importância (ROSA *et al.*, 2012).

É de suma importância a ingestão diária de antioxidantes dietéticos, visto que o sistema de defesa antioxidante humano não é completo sem os antioxidantes dietéticos, e os componentes celulares não são totalmente protegidos por antioxidantes endógenos, o que reforça a importância da ingestão diária destes

compostos. Assim, o consumo de antioxidantes traz inúmeros benefícios ao organismo humano contribuindo para uma melhoria na qualidade de vida da população (BIANCHI; ANTUNES, 2011; NUNES; MERCADANTE, 2011). Grande interesse tem sido voltado para o papel do estresse oxidativo e dos radicais livres na etiologia de várias doenças como as cardiovasculares, cânceres, aterosclerose, inflamação e envelhecimento (PAULA *et al.*, 2011). Nesta perspectiva, existe um grande estímulo relacionado à busca por novas substâncias obtidas de plantas com potencial antioxidante (PAULA *et al.*, 2011).

4.4. COMPOSTOS FENÓLICOS

A crescente demanda nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica e a necessidade de reutilizar a grande quantidade de subprodutos agrícolas gerados anualmente têm despertado especial interesse em materiais residuais que sejam fontes de compostos bioativos passíveis de reaproveitamento (RUBIO, 2017). As plantas sintetizam uma grande variedade de compostos orgânicos que são classificados como metabólitos primários ou secundários. Metabólitos primários são os compostos que tem papel essencial, associado à fotossíntese, respiração, crescimento e desenvolvimento, e incluem fitoesteróis, lipídios, nucleotídeos, aminoácidos e ácidos orgânicos (CROZIER, CLIFFORD E ASHIHARA, 2006).

Outros compostos, que se acumulam muitas vezes em altas concentrações e variedades em algumas espécies, são denominados metabólitos secundários (CROZIER, CLIFFORD E ASHIHARA, 2006; WINK, 2010). Nas plantas, possuem papel fundamental na proteção frente a ataques de insetos e microrganismos, sendo também responsáveis por atrair polinizadores e animais que se encarregam da dispersão de sementes. Além disso, são protetores de radiação UV, e auxiliam na fixação de nitrogênio, em algumas espécies (CROZIER, CLIFFORD E ASHIHARA, 2006; TAIZ E ZEIGER, 2004). De acordo com Crozier, Clifford e Ashihara (2006), os metabólitos secundários podem ser divididos em três grandes grupos: compostos fenólicos, terpenoides e alcaloides.

Os polifenóis são sintetizados por plantas em condições normais de desenvolvimento (FRAGA, 2009; PRIDHAM, 1960; TAIZ E ZEIGER, 2004) e principalmente em resposta a condições de estresse, tais como infecções, ferimentos,

radiação ultravioleta, estresse hídrico, dentre outros (NICHOLSON E HAMMERSCHMIDT, 1992; SHAHIDI E NACZK, 2004). Compreendem uma grande família, que varia de ácidos fenólicos, de cadeias bastante simples, até polímeros de cadeia complexa, como taninos e lignina (BRAVO, 1998; HOPKINS E HÜNER, 2008).

Os fenóis se classificam em dois grandes grupos: flavonoides e não- flavonoides (CROZIER, CLIFFORD E ASHIHARA, 2006; FRAGA, 2009). O grupo dos flavonóides está dividido nas subclasses: flavonois, flavonas, flavanonas, flavan-3-óis, antocianidinas e isoflavonas (CROZIER, CLIFFORD E ASHIHARA, 2006; FRAGA, 2009). Os flavonoides têm em sua estrutura 15 carbonos, dispostos em três anéis: C6-C3-C6 (denominados A, B e C). Os dois anéis de seis carbonos são aromáticos (FRAGA, 2009; PIETTA, 2000). As classes de flavonoides são diferenciadas entre si devido ao nível de oxidação e ao padrão da substituição do anel C; já os compostos individuais, dentro de cada uma das classes, diferem entre si devido ao padrão de substituição dos anéis A e B (PIETTA, 2000).

Os flavonóis são os flavonoides mais difundidos, podendo ser incolores ou amarelos, e tem como principais representantes a miricetina, quercetina, isoramnetina e campeferol (CROZIER, CLIFFORD E ASHIHARA, 2006; FRAGA, 2009). São comumente encontrados na forma glicosilada. As flavonas são pouco difundidas, encontradas em alguns vegetais específicos, podendo ser encontradas hidroxilada, metilada, alquilada ou glicosilada, e as principais representantes são a apigenina e a luteolina (CROZIER, CLIFFORD E ASHIHARA, 2006; FRAGA, 2009). As flavanonas são altamente reativas, podendo submeter-se às reações de hidroxilação, glicosilação ou metilação (CROZIER, CLIFFORD E ASHIHARA, 2006; FRAGA, 2009).

As frutas representam ricas fontes de vitaminas, açúcares e compostos bioativos (incluindo fibras e compostos fenólicos) e estão frequentemente relacionadas com a redução do risco da maioria das doenças crônicas degenerativas (SINGH et al., 2016). O reconhecimento dos valores nutricionais e terapêuticos e a crescente preocupação do consumidor com a saúde tiveram um grande impacto no consumo de frutas (HAMINIUK *et al.*, 2011).

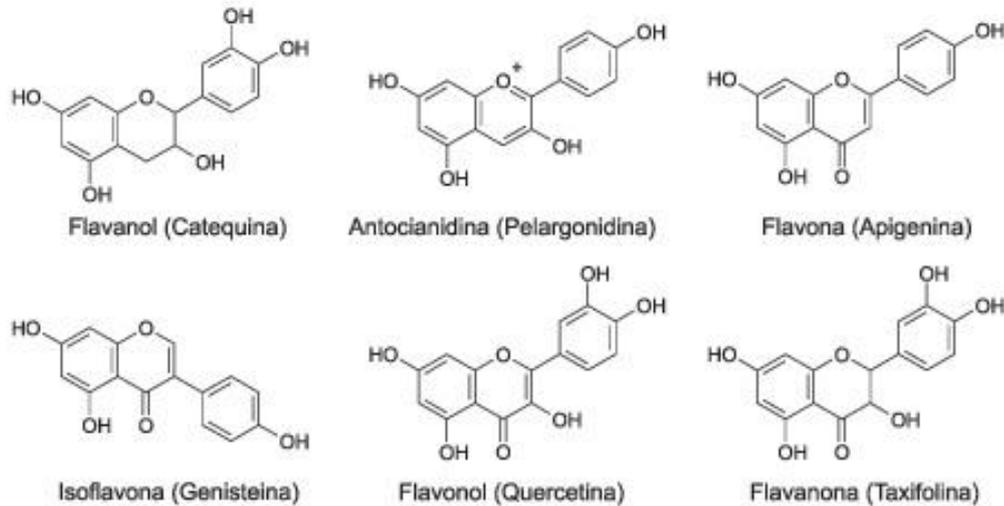
4.4.1 Compostos Fenólicos Da Uva

A produção de uva (*Vitis vinifera L.*) aproximadamente 75,1 milhões de toneladas em 2013 – representa o maior cultivo mundial de fruta (MEDOUNI-ADRAR et al., 2015) e tem a maior parte destinada à produção de alimentos (ZAGKLIS; PARASKEVA, 2015). Estudos epidemiológicos sugerem efeitos benéficos da uva na saúde humana, relacionando o consumo moderado da bebida com a prevenção de doenças cardíacas. Esses efeitos são atribuídos ao conteúdo de compostos fenólicos (ZAGKLIS; PARASKEVA, 2015).

As uvas contêm uma quantidade considerável de diferentes compostos fenólicos, presentes nas folhas, cascas, polpa e sementes, os quais são responsáveis por propriedades de interesse, relacionadas principalmente com sua atividade antioxidante. A composição química é um dos critérios mais importantes para determinação da qualidade de produtos derivados da uva, uma vez que a concentração de compostos fenólicos e ácidos orgânicos confere características sensoriais para a uva e seus derivados. Essa concentração depende da variedade da uva e é influenciada por fatores climáticos e ambientais, práticas de cultivo e o estágio de maturação (FARHADI *et al.*, 2016; SILVA; QUEIROZ, 2016).

Os polifenóis encontrados na uva incluem: Flavonoides: antocianinas (monoglicosídeos de malvidina, cianidina, petunidina, peonidina e delphinidina), flavan-3-óis (de catequinas monoméricas a proantocianidinas, flavonois (miricetina, quercetina, campeferol, isoramnetina e seus glicosídeos) (Guerrero et al., 2009; Monagas, Bartolome e Gomez-Cordove, 2005). Não-flavonoides: estilbenos (principalmente o resveratrol), ácidos fenólicos e hidroxicinamatos (ácidos hidroxicinâmicos) (ácido p-cumárico e ácido cafeico) (Guerrero et al., 2009; Monagas, Bartolome e Gomez-Cordove, 2005; Obreque-Slier et al., 2010).

Figura 3. Estrutura das principais classes dos Flavonóides



Fonte: (CERQUEIRA et al., 2007)

As antocianinas são as principais responsáveis pela coloração das uvas, encontrando-se assim, em maior concentração na casca (Monagas, Bartolome e Gomez-Cordove, 2005), enquanto os flavan-3-óis vão conferir adstringência e amargor (Gawel, 1998; Hufnagel e Hofmann, 2008; Obreque-Slier et al., 2010), podendo ser encontrados na casca e em maior quantidade nas sementes (Simón, Hernández e Estrella, 1993; Obreque-Slier et al, 2010). Já os flavonóis vão contribuir com amargura e cor, e estão localizados na casca (Gawel, 1998; Obreque-Slier et al., 2010).

Os compostos fenólicos possuem anel aromático em sua estrutura química e têm estrutura variável, conferindo a eles características multifuncionais. O grupo dos fenólicos é composto por moléculas simples e moléculas com alto grau de polimerização, as quais podem estar ligadas nos vegetais em sua forma livre ou associadas a açúcares e proteínas (RUBIO, 2017). Dentre os fenóis distintos presentes na natureza, destacam-se os flavonoides (incluindo as antocianinas), ácidos fenólicos e taninos (ANGELO; JORGE, 2007). No bagaço de uva são encontrados fenólicos como o ácido gálico, a catequina, ácido cafeico, ácido siringico, epicatequina, rutina, resveratrol e quercetina (ROCKENBACH et al., 2011;

TOURNOUR et al., 2015). Os compostos fenólicos estão presentes em todas as frutas como um grupo de metabólitos secundários, ou seja, componentes que não são essenciais para a sobrevivência da fruta inteira ou de certas partes dela (RUBIO, 2017).

A síntese desses metabólitos ocorre durante o desenvolvimento normal de plantas, em resposta a diferentes situações, tais como estresse e radiações ultravioleta (HAMINIUK et al., 2012). No Brasil, a maior parte do bagaço da uva é tratado como resíduo com baixos lucros, utilizado na alimentação animal (ROCKENBACH et al., 2011). Apesar de o bagaço representar problemas, tanto do ponto de vista biológico quanto econômico, para estocagem, transformação ou eliminação, representa uma fonte acessível de antioxidantes naturais, o que torna o seu reaproveitamento uma oportunidade de interesse para as indústrias de alimentos, fármacos ou cosméticos, principalmente no que diz respeito à recuperação dos compostos bioativos desse resíduo agroindustrial (BARCIA et al., 2014; LÓPEZ-MIRANDA et al., 2016).

O primeiro passo para a utilização dos compostos fenólicos para aplicação na indústria é a extração. O método mais utilizado é a extração sólido-líquido, que submete o bagaço da uva ao contato com diferentes tipos de solventes orgânicos, como o etanol, metanol, acetona e acetato de etila (LÓPEZ-MIRANDA et al., 2016), entretanto, prefere-se a utilização de misturas de água e etanol nas indústrias, por não afetarem a saúde humana (ZAGKLIS; PARASKEVA, 2015).

Pesquisas recentes abordam a capacidade antioxidante, antiradical, antimicrobiana, anti-inflamatória e cardioprotetora das substâncias bioativas. A importância destas substâncias, torna o estudo de subprodutos interessante para as indústrias de alimentos, nutracêutica, farmacêutica e química, principalmente devido à possibilidade de aproveitar os resíduos, ricos em compostos fenólicos, para produção de extratos e novos produtos de manutenção da saúde humana (RUBIO, 2017). A extração dos bioativos de materiais derivados das práticas industriais representa uma alternativa atrativa, sustentável e de baixo custo para obter bioativos com alto valor biológico e farmacológico os quais podem ser incorporados em alimentos ou cosméticos (JARA-PALACIOS et al., 2015). Na FIGURA 4 observa-se o modelo do sistema de plantio e cultivo de videiras.

Figura 4. Modelo do sistema de plantio de videiras.



Fonte: IBRAVIN (Instituto Brasileiro do Vinho)

4.5. ENSAIOS DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE ATRAVÉS DO TESTE DE DPPH

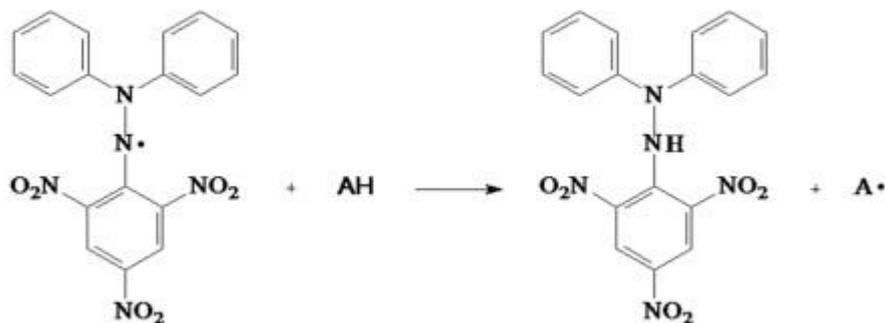
Em 1922, Goldschmidt e Renn descobriram um radical livre estável de cor violeta, que atualmente tem sido usado como reagente colorimétrico para processos de oxidação-redução. O DPPH (2,2-difenil-1-picril hidrazil) pode ser mantido indefinidamente com pouca decomposição porque ele não reage com o oxigênio. O método provou ser bastante útil em série de investigações, tais como a determinação das propriedades antioxidantes de amins, fenóis ou compostos naturais (vitaminas, extratos vegetais, medicamentos) (VEDANA, 2008).

As vantagens do método DPPH são, avaliar uma grande quantidade de amostras em um período curto de tempo e rapidamente. É um método sensível que detecta pequenas concentrações do ativo testado e além disso, permite avaliar antioxidantes lipofílicos, já que o solvente do processo é metanol ou etanol (REZENDE, 2010). O radical estável DPPH reage com a substância antioxidante e é convertido a 2,2-difenil-1-picril hidrazina. O grau de descoloração indica a capacidade do extrato em sequestrar o radical livre (RUFINO *et al.*,2007). Um alto potencial de sequestrar

radicais livres é expresso através de um baixo índice de IC₅₀, pois quanto menor a concentração necessária do extrato para inibir a oxidação do radical em 50%, maior potencial antioxidante.

Brand-Williams e colaboradores (1995) propuseram o método envolvendo a utilização do 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH), no qual compostos antioxidantes reagem com o radical estável em uma solução de metanol ou etanol. A redução do DPPH é acompanhada pelo monitoramento do decréscimo na absorbância em comprimento de onda característico durante a reação. Em sua forma radical, o DPPH apresenta absorbância máxima a 517 nm (nanômetros), mas sob redução por um antioxidante (AH) ou uma espécie radical (R) a absorbância diminui.

Figura 5. Mecanismos de reação entre o radical DPPH e um antioxidante através da transferência de um átomo de hidrogênio.



Fonte: (REZENDE 2010).

Esse método continua sofrendo muitas modificações ou adaptações e por isso vários procedimentos ou protocolos para o DPPH têm sido relatados, incluindo diferentes solventes para dissolver o radical DPPH, diferentes concentrações iniciais da solução de DPPH, diferentes alíquotas das várias substâncias utilizadas e da solução inicial de DPPH, diferentes tempos de reação com o radical DPPH (REZENDE, 2010).

O DPPH pode agir como um capturador de outros radicais livres ou de substâncias neutras capazes de estabilizá-lo. As substâncias com propriedades

antioxidantes possuem essa capacidade. No teste de captura com DPPH ocorre uma reação de oxi-redução, onde o DPPH, que apresenta coloração violeta, é reduzido, ou seja, o elétron desemparelhado do nitrogênio se emparelha com o elétron cedido por um radical hidrogênio de um antioxidante, tornando a solução amarela e ocorrendo a formação do DPPH-H, reduzido e estável. É essa característica de mudança de coloração que permite o acompanhamento visual da reação (REZENDE, 2010).

A capacidade de sequestro do radical livre DPPH pela amostra é determinada pela habilidade de transferência de hidrogênio para o radical livre estável DPPH. Este método pode ser utilizado para avaliar a atividade antioxidante de compostos específicos ou de um extrato em um curto período de tempo. Portanto, este método tem sido uma ferramenta útil para avaliar a capacidade antioxidante de frutos (BORGUINI, 2006). A intensidade da cor varia de acordo com a concentração, como mostra a Figura 6.

FIGURA 6: Representação da reação da atividade antioxidante pelo método do DPPH



Fonte: (Modificado de VEDANA, 2008)

Prado, (2009) descreve que os modelos como DPPH são práticos e recomendados para a avaliação da capacidade antioxidante total de frutas, visto que o sequestro de radicais livres é um dos mecanismos reconhecidos pelo qual ocorre a ação dos antioxidantes.

Assim, na presença de um doador de hidrogênio ou elétron a intensidade de absorção diminui e a solução com o radical perde cor, tornando-se amarela, ou seja, quando o

elétron desemparelhado do átomo de nitrogênio recebe um átomo de hidrogênio proveniente de compostos antioxidantes, ocorre a mudança de cor (PRADO, 2009).

Entre os métodos químicos aplicados para determinar a capacidade antioxidante de um composto em capturar radicais livres, o método DPPH é um dos mais utilizados por ser considerado rápido, prático e estável. Além disso, o DPPH apresenta vantagens quando os antioxidantes analisados são mais solúveis em solventes orgânicos e representa, portanto, um excelente método para medir a atividade antioxidante em frutas e sucos de frutas (PRADO, 2009).

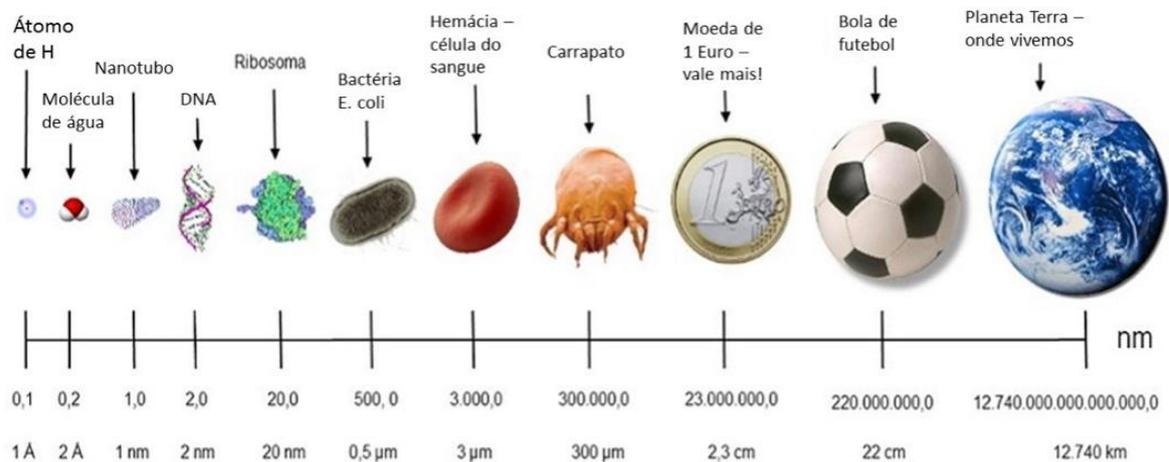
4.6. NANOTECNOLOGIA

Nas últimas décadas, está cada vez mais eminente o uso da nanotecnologia para produção de nanoformulações e/ou nanomateriais, os quais podem ter diversas aplicações, tais como detectar doenças com alta sensibilidade, melhorar a eficiência de atuais sistemas de entrega de princípios ativos, dispersar substâncias hidrofóbicas em fases aquosas e aumentar a absorção pelo sistema gastrointestinal (GHOSH et al., 2013). A nanotecnologia representa uma combinação única das áreas Matemática, Física, Química, Biologia, Informática e Ciências dos materiais, que visam investigar e manipular a matéria na escala de nanômetros. Estruturas modificadas são comparadas em tamanho a moléculas biológicas, isso tem sido reconhecido desde 1950 (BARKALINA et al., 2014)

Nanotecnologia é uma área do conhecimento que causa muita curiosidade e expectativa, especialmente para a parcela da sociedade na qual o tema é pouco difundido. Um mundo desconhecido e cheio de mistérios que pouco a pouco vem sendo desmistificado. É evidente a preocupação em levar para a população uma melhor compreensão (FERREIRA, 2016). A etimologia do termo nano, prefixo da palavra nanotecnologia, é atribuída ao grego nanno-, de nános ‘anão’, e tem sua origem documentada em vocábulos eruditos, a partir do século XIX (CUNHA, 2012). A este prefixo é creditada a intenção dos cientistas de representarem partículas de magnitude demasiadamente pequenas, os nanômetros (nm), conforme destaca Santos Júnior (2011).

Ainda segundo Santos Júnior (2011) o termo nano também serve como parâmetro de medida, um nanômetro (nm) equivalendo à bilionésima parte de um metro. A demonstração da escala manométrica, apresentada na Figura 7, ilustra como as nanoestruturas podem ser representadas em dimensões dezenas de mil vezes menor do que a do diâmetro de um fio de cabelo, como no exemplo apresentado. Santos Junior (2011) acrescenta ainda que um átomo mede cerca de dois décimos de um nanômetro (0,2 nm) e um vírus cerca de 100 nanômetros (100nm).

Figura 7. Escala comparativa entre o mundo nano e o macro. Comparação entre o tamanho do menor átomo, o H, ao tamanho do planeta Terra.



Fonte: (RESENDE, 2016)

O rápido desenvolvimento da nanotecnologia aplicada só começou a partir de 1981 com a descoberta da técnica de Microscopia de Varredura por Tunelamento, pela empresa International Business Machines Corporation - IBM de Zurich, e alguns anos mais tarde, com a Microscopia de Força Atômica. Ambos os métodos permitem a visualização e manipulação da matéria em pequena escala com excepcional exatidão, onde desencadeou um crescimento exponencial na área de nanociência (BARKALINA et al., 2014). Trata-se, portanto, de tecnologias em escala de nível atômico e molecular no qual o nanômetro constitui a medida de extensão (CORREIA et al., 2016).

Para otimizar as qualidades das substâncias cosméticas, a indústria aliou os cosméticos a sistemas multiparticulares, dando origem a designação de nano-cosmético. (CORREIA et al., 2016). Os nano-cosméticos pretendem aumentar a permeabilidade nas camadas cutâneas, diminuir a quantidade de ativos para ter o mesmo efeito que um cosmético convencional, proteger os ativos, aumentando a sua estabilidade à degradação. Além disso visam melhorar o desempenho dos cosméticos, diminuir os riscos de irritação na pele através de uma libertação gradual do ativo e possibilitar a diminuição da toxicidade dos cosméticos (ANTUNES, 2016). Atualmente, a nanotecnologia voltada para a cosmética tem como foco, sobretudo os produtos destinados à aplicação na pele do rosto e do corpo, com ação antienvhecimento e de foto-proteção (LEITE et al, 2015).

4.6.1 Sistemas Carreadores

A busca por novos fármacos e ferramentas para o tratamento de doenças constitui um desafio constante no âmbito farmacêutico. O futuro da terapia genética como estratégia terapêutica depende da solução de suas limitações (ZORZI et al., 2017). O primeiro obstáculo está relacionado com o conhecimento sobre a doença e se a expressão de determinada proteína desempenha um papel na fisiopatologia dessa doença. A segunda dificuldade se refere à busca de um sistema que seja ao mesmo tempo capaz de proteger o material genético e transportá-lo de maneira eficaz até o seu local de ação, sem representar riscos para a saúde (ZORZI et al., 2017).

Nesse sentido, diferentes veículos estão sendo estudados como ferramentas que permitem a transferência de material genético exógeno à célula. Fundamentalmente, é possível diferenciar dois tipos de sistemas transportadores: vetores virais (adenovírus, lentivírus, etc) e vetores não virais ou sintéticos (complexos, micelas, lipossomas, nanopartículas, entre outros).

Do ponto de vista químico, os vetores não virais são os mais interessantes especialmente devido a sua segurança (ZORZI et al., 2017). Com o passar dos anos, os carreadores de base nanotecnológica têm ganhado atenção devido à

capacidade de superação das limitações tanto da terapia genética como da administração de fármacos (ZORZI et al., 2017).

As características mais importantes dos sistemas carreadores são a capacidade de proteger o material genético, internalização celular específica, estabilidade, cinética de liberação compatível com a via de administração, fácil obtenção e preço acessível. Já os biomateriais empregados na construção desses vetores, devem possuir biocompatibilidade, biodegradabilidade, estabilidade química, devem ser de fácil obtenção e ter preço acessível (ZORZI et al., 2017). Nanopartículas são estruturas geralmente compostas por polímeros, lipídios ou combinações de ambos. Dependendo dos constituintes e do método de preparo, o material genético pode estar associado no interior da estrutura ou adsorvido em sua superfície (SAHOO, 2008).

Quando esses sistemas contêm um polímero (geralmente insolúvel em água), o termo nanopartícula pode se referir tanto à estrutura com núcleo completamente matricial (nanoesfera) quanto à com núcleo oleoso (nanocápsula) (ZORZI et al., 2017). Nanopartículas obtidas a partir de polímeros hidrofílicos são preparadas principalmente por geleificação iônica, coacervação ou nanoprecipitação, permitindo uma associação de material hidrofílico, como o material genético, no interior da partícula, o que oferece uma maior proteção contra a degradação (GAUDANA, 2008). Nanopartículas contendo polímeros hidrofóbicos pré-formados invariavelmente necessitam de solvente orgânico, utilizado para a solubilização do polímero, e podem eventualmente desnaturar o ácido nucleico utilizado (NAGARWAL et al., 2009). Nanopartículas lipídicas sólidas são estruturas formadas por lipídios que são sólidos em temperatura ambiente e temperatura corporal (SOUTO, et al., 2007; SOUTO, et al., 2008).

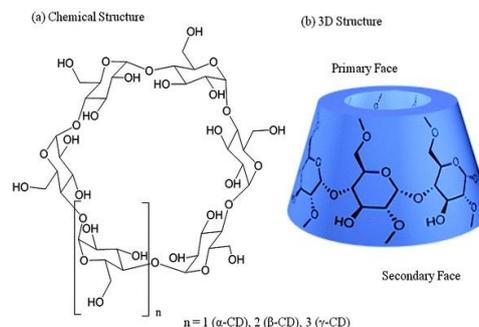
Existem basicamente dois métodos de preparo: homogeneização à alta pressão e o método de microemulsão. Dependendo do método de preparo pode ser a necessária a presença de um surfactante ou co-surfactante (MUCHOW, et al., 2008). Assim, normalmente o material genético é adsorvido a nanopartículas pré-formadas, de maneira similar ao que ocorre com as nanoemulsões (ZORZI et al., 2017).

4.6.2 Ciclodextrina

Ciclodextrinas (CD) São oligossacarídeos cíclicos constituídos por seus, sete ou oito unidades de glicose, nomeadas respectivamente de Alfa-CD, Beta-CD ou Gma-CD, unidas por ligações de alfa-(1,4) (SOUZA, 2016) Esses compostos são formados por uma enzima, a glucanotransferase (CGTase), produzida por alguns microorganismos, e que realiza as ligações de transglicosilação a partir da degradação do amido, formando a estrutura cíclica das CDs (RAJPUT; PATEL; TRIVEDI, 2016) Sua configuração tridimensional mais estável apresenta-se no formato de um cone truncado e as ciclodextrinas mais comuns são as α -, β - e γ -ciclodextrinas. (URBAN, et al., 2016).

Estes açúcares apresentam uma cavidade interna apolar (hidrofóbica), devido ao posicionamento do oxigênio das ligações glicosídicas e aos hidrogênios das unidades glicopiranoses, e uma superfície externa polar (hidrofílica), devido à posição ocupada pelas hidroxilas primárias unidas ao carbono C6 e hidroxilas secundárias ligadas aos carbonos C2 e C3 (URBAN, et al., 2016). A presença da cavidade hidrofóbica possibilita que as ciclodextrinas sejam capazes de alojar uma molécula hóspede ou sua parte, formando, assim, um complexo de inclusão (URBAN, et al., 2016). A Figura 8 representa a esquematização da estrutura química e tridimensional das ciclodextrinas.

Figura 8. Estrutura química da ciclodextrina. Estas possuem superfícies polares e hidrofílicas e uma região central apolar e hidrofóbica.



Fonte: (Adaptado de SOUZA, 2016; ZHOU; RITTER 2010)

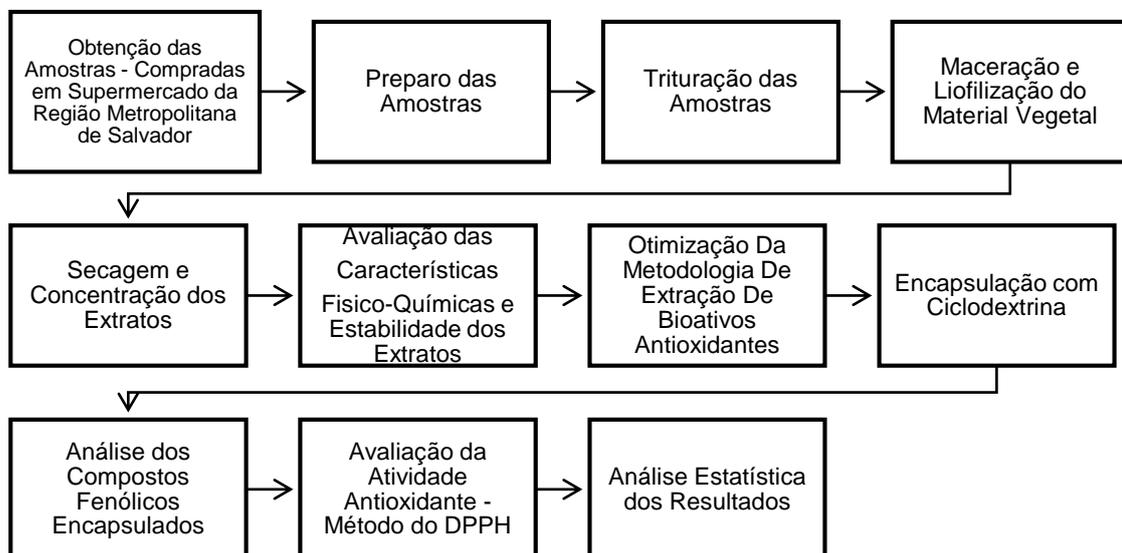
Após a dissociação, o fármaco estará na forma livre e apto para ser absorvido e distribuído pelo organismo, uma vez que complexado ele não consegue atravessar as membranas plasmáticas devido à hidrofília da ciclodextrina, característica que justifica sua baixa toxicidade (URBAN, et al., 2016 *apud* LOFTSSON et al., 1996; HOPPE, 1997; UEKAMA, 2004).

A técnica de microencapsulação apresenta um grande potencial de aplicação para o aprimoramento e desenvolvimento de estruturas para a conservação dos produtos naturais. É um método em os compostos bioativos são incorporadas numa matriz ou num sistema de revestimento com a finalidade de isolamento, proteção contra fatores e uma taxa de liberação controlada dos compostos bioativos (SOUZA, 2016).

5. Metodologia

Para a realização deste trabalho foram realizadas etapas de coleta, armazenamento, preparo e análise das amostras. Tais etapas podem ser evidenciadas de forma mais esclarecida na Figura 9, onde primeiramente realizou-se a obtenção das amostras a partir de sua compra em um supermercado da região metropolitana de Salvador.

Figura 9. Fluxograma das etapas metodológicas realizadas.



5.1 LOCAIS DE DESENVOLVIMENTO

Os procedimentos foram realizados nos laboratórios de Farmacotécnica, Farmacognosia e Toxicologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, localizados no Campus de Ondina – Salvador / Bahia.

5.2 EQUIPAMENTOS

As pesagens foram feitas em balança analítica (AND®, modelo HR 200). Para a secagem utilizou-se o Liofilizador da marca e o *Spray Dryer* da marca. Além disso, foi utilizado e evaporador rotatório, objetivando a concentração dos extratos à pressão reduzida, foi da marca IKA RV 10®digital (220V), com temperatura na faixa entre 40°C. Para algumas análises de fenólicos totais e flavonoides utilizou-se o banho maria da marca. A determinação da atividade antioxidante foi feita pela leitura de absorvância em equipamento ELISA (Biotek®), modelo EL800.

5.3 REAGENTES

Todos os reagentes e solventes utilizados possuíam grau de pureza analítico (PA).

Figura 10. Descrição dos reagentes utilizados durante o desenvolvimento do projeto exposto.

REAGENTES	FABRICANTE
DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila)	SIGMA-ALDRICH ®
BHT (butil hidroxitolueno)	SIGMA-ALDRICH ®
Carbonato de sódio	SIGMA-ALDRICH ®
Folin-Ciocalteu	SIGMA-ALDRICH ®
Álcool etílico 95%-	LABSYNTH ®
Álcool metílico P.A	ÁLCOOL METÍLICO P.A ®
Ácido gálico padrão primário de referência, teor de pureza 99,95%	SIGMA-ALDRICH ®
Quercetina padrão de primário de referência, teor de pureza 100%	SIGMA-ALDRICH ®

5.4 AMOSTRAS

Para esse trabalho foi realizada a comparação de amostras de *Vitis vinífera*. A uva *in natura* e um suco de uva integral adquirido em mercados de Salvador. As uvas foram compradas em supermercado da Região metropolitana da cidade de Salvador – Bahia, as quais são distribuídas pela Cooperativa Agrícola de Juazeiro (CAJ) Bahia. As uvas produzidas na cooperativa são da espécie *Vitis Vinífera*, contemplando as variedades Italia Muscate, Red Globe, Brasil, Benitaka, Sweet Jubilee e Núbia – todas com sementes.

Há ocorrência também das variedades Thompson, Crimson, Festival, Arra 15, Sugar Crisp, Vitória, Isis, Celebration, Timco, Sweet Globe, Cotton Candy, entre outras – todas sem sementes. Para o projeto utilizou-se a variedade Vitória, estas se desenvolveram em um período de 10 a 12 meses e durante esse período, houve a necessidade de tratamentos diários para a condução da mesma. Após os 12 meses, foi realizada a poda de produção, e a partir daí, durante um ciclo de cerca de 120 dias, o fruto chegou ao ponto de colheita / embalagem, segundo informações do produtor.

Em sequência, a área que estava em produção, repousa por cerca de 60 dias, para que então, ocorra nova poda de produção, e assim o ciclo se perpetue. O suco de uva, também comprado em supermercado da região tem origem no Vale dos Vinhedos (RS), É Integral e sem adição de açúcar. Fonte de nutrientes e energético, é um *blend*, uma mistura de duas variedades de uva: Isabel e Bordô, não possuindo conservantes ou qualquer aditivo químico em sua composição. Para o seu preparo foi realizado o desengace das uvas frescas. Seu cozimento foi realizado através de vapor a temperatura de 80° C.

A etapa seguinte procedeu-se a separação de sólidos e líquidos. A fase líquida engarrafamento foi realizado a uma temperatura de 80°C em garrafas de vidro e fechamento com tampa twist-off. A temperatura da adega é controlada sendo mantidos os produtos a 20°C. Por fim é feita a maturação do produto por 02 meses até ocorrer estabilização dos componentes do suco e seu prazo de validade é de 2 anos. Seu método de elaboração, a partir do aumento de temperatura, extrai 1 litro de suco a cada 1,7 quilos de uva, segundo informações do fabricante.

5.4.1 Preparo das amostras de uva e suco de uva industrializado integral

Os frutos de uvas da variedade Vitória foram armazenadas em Freezer – 20°. O peso das uvas inicialmente foi equivalente à 490 gramas sendo este o peso ainda com os talos. Após congelamento, foram lavadas com água potável e álcool etílico 70%, separada as uvas dos talos, desprezando os talos e triturando polpa e casca. As uvas desta variedade não apresentaram sementes. Antes de iniciar a extração é necessário uma trituração dos uvas, a qual foi realizada através de processador PHILCO resultando em um volume equivalente à 4 litros e sem adição de solvente para auxiliar no processo.

O objetivo da trituração foi diminuir o tamanho dos sólidos para aumentar a área da transferência de massa e por consequência a eficiência na obtenção do seu extrato. O suco de uva integral industrializado fora mantido até a realização dos testes e demais preparos em temperatura ambiente.

5.4.2 Liofilização das amostras

Novas tecnologias permitem processar a fruta na forma de pó, fazendo com que o fruto, que antes era consumido só em sua época de safra, hoje possa ser consumido em qualquer período do ano. A liofilização é o melhor método de secagem para materiais termosensíveis e para a obtenção de produtos desidratados com elevada qualidade. Para a concentração dos extratos realizou-se o processo de liofilização. Ele faz com que a água contida no produto, passe do estado sólido (produto congelado) para o estado gasoso sem passar pelo estado líquido, ocorrendo desta forma, o processo de sublimação (IBARZ e BARBOSA-CÁNOVAS, 2012).

As vantagens da liofilização perante outros tipos de secagem são decisivas, uma vez que, reduz em muito a desnaturação oxidativa e também as reações degradativas (MUJUMDAR 2010). O produto pode ser reconstituído com grande facilidade, pois a estrutura dos poros formada se assemelha a uma colméia (COHEN & YANG, 1995). Isso gera uma boa permeabilidade no produto. Além disso, ocorre preservação das propriedades químicas e/ou físicas do material e suas condições operacionais não

propiciam a desnaturação protéica, nem a perda de compostos voláteis (sabor e aroma). Por fim, a liofilização dificulta a proliferação de microorganismos (COHEN & YANG, 2009).

Após trituradas, as amostras da uva vitória *in natura* passaram pelo processo de liofilização para obtenção da amostra seca. Os 4 litros obtidos no processo anterior, resultaram em uma amostra seca de volume equivalente à 156,39 gramas. O suco de uva integral também passou pelo processo de liofilização, sendo retirado do seu volume total uma alíquota de 2,25 mL subdivididas em 9 amostras de 0,25mL acondicionadas em tubos falcon e mantidas em congelador -20°C para então serem liofilizadas. Sua massa final foi de 11,39 gramas e para este processo não houve adição de solvente. As amostras ficaram acondicionadas no liofilizador e o período de secagem durou 4 horas. Este período resultou no tempo suficiente para sua total secagem. Após isto, foram lacradas hermeticamente, mantidas em geladeira (- 20°C) e protegidos da luz até a data de execução dos testes.

FIGURA 11. Representação do modelo do liofilizador utilizado para o processo de produção de amostras secas.



O modelo utilizado é composto por prateleiras de metal as quais apoiam as amostras no processo de liofilização. Seu método de encaixe ocorre por vácuo.

5.4.3 Maceração dos extratos

Extratos brutos vegetais são, normalmente, misturas complexas constituídas quase sempre por diversas classes de produtos naturais, contendo diferentes grupos funcionais. O processo de separação desses produtos naturais bioativos corresponde a três fases principais: extração a partir da matéria vegetal, fracionamento do extrato ou líquido extrator e purificação do princípio ativo (JUNIOR et al, 2005). O termo extração significa retirar, da forma mais seletiva e completa possível, as substâncias ou fração ativa contida na droga vegetal, utilizando, para isso, um líquido ou mistura de líquidos tecnologicamente apropriados e toxicologicamente seguros (SIMOES et al, 2002).

Ao escolher o método extrativo, deve-se avaliar a eficiência, a estabilidade das substâncias extraídas, a disponibilidade dos meios e o custo do processo escolhido, considerando a finalidade do extrato que se quer preparar. A maceração é a operação na qual a extração da matéria prima vegetal é realizada em recipiente fechado, em temperatura ambiente, durante um período prolongado (horas ou dias), sob agitação ocasional com e/ou sem renovação do líquido extrator (processo estático). Pela sua natureza, não conduz ao esgotamento da matéria prima vegetal, seja devido à saturação do líquido extrator ou ao estabelecimento de um equilíbrio difusional entre o meio extrator e o interior da célula. Foi realizada a técnica da remaceração nas amostras de uva *in natura*. Esta técnica caracteriza-se quando a operação é repetida utilizando o mesmo material vegetal, renovando-se apenas o líquido extrator (SIMOES et al, 2002). Este processo restringe-se quando se trabalha com substâncias ativas pouco solúveis, plantas com elevado índice de intumescimento e possíveis proliferações microbianas. Apesar dos inconvenientes apresentados, ainda é uma das técnicas extrativas mais usuais devido à simplicidade e custos reduzidos (NAVARRO, 2005).

A extração por maceração o sólido-líquido desenvolveu-se por meio de imersão de solvente com temperatura ambiente. A metodologia foi definida em virtude da termos sensibilidade das antocianinas e flavonóides para temperaturas superiores a 90°C, segundo Baaka et. al, (2015), assim como aos fins econômicos para um estudo de viabilidade econômica utilizando um método com menor demanda de energia.

As principais variáveis estudadas estão correlacionadas com o estudo do solvente, presença de luz e umidade do resíduo seco. Para a fase da obtenção do extrato concentrado, realizou-se o processo da Maceração. Para cada amostra da uva vitória in natura previamente triturada e liofilizada, adicionou-se o líquido extrator (álcool etílico a 50%). Adicionou-se em dois frascos âmbar a amostra liofilizada sem qualquer tipo de solvente sendo divididos sua massa total e acondicionados no frasco juntamente com o líquido extrator.

A quantidade de líquido extrator utilizado durante o procedimento foi de 500mL para os 78 gramas de amostra, por frasco. As amostras foram submetidas à técnica de maceração e remaceração, sendo eles realizados em 03 ciclos de 72 horas cada. As amostras foram mantidas em condições protegidas da luminosidade (sob a proteção de papel alumínio e em frasco de vidro âmbar), em temperatura ambiente (aproximadamente 26°C) durante todo o período de maceração e remaceração.

Após o processo, o resíduo insolúvel fora separado do solvente através do processo de filtração, utilizando como meio filtrante gaze de tecido de algodão estéril. E todo o filtrado foi acondicionado em frasco âmbar sob refrigeração à aproximadamente -6°C até a realização dos testes. A quantidade de amostra fluida foi de aproximadamente 1500mL. É importante evidenciar que a organização da sequência das operações propostas anteriormente é fundamental para garantir que os resíduos não percam as estruturas dos componentes responsáveis pela cor, devido a presença dos fatores que as alteram (luz, oxigênio, temperatura elevada, pH).

5.4.4 Secagem por atomização ou Spray Dryer

A remoção de água de produtos é uma prática bastante comum na indústria de alimentos, como forma de assegurar a estabilidade microbiológica dos mesmos, prevenir reações de degradação, reduzir o custo de armazenamento e transporte, além de obter um produto com propriedades específicas como, por exemplo, solubilidade instantânea (CALISKAN e DIRIM, 2013; COUTO et al., 2012; GHARSALLAOUI et al., 2007; MISHRA et al., 2014; SINGH e DIXIT, 2014).

A secagem por *spray dryer* pode ser citada como um processo comum para tais finalidades. A secagem por nebulização ou *spray dryer* consiste em uma operação unitária através da qual um produto (solução, emulsão ou suspensão) é transformado do estado fluido para o estado sólido em forma de pó dentro de uma câmara, onde é feita a dispersão de gotículas do material, que entram em contato com um gás aquecido, em geral, o ar (GHARSALLAOUI et al., 2007; MASTERS, 1979). O *spray dryer* é bastante utilizado para microencapsulação de ingredientes (ARARUNA et al., 2013; BOTREL et al., 2014a; HIJO et al., 2015).

5.4.5 Concentração dos extratos

Após o processo de maceração, uma alíquota correspondente a 300mL do extrato fluido total foi usada para iniciar o processo da secagem. Tal metodologia foi realizado tanto para o extrato de uva vitória *in natura* quanto para o suco de uva integral (sem liofilizar). Os extratos foram concentrados em evaporador rotatório (Q344M2-QUIMIS), sob pressão reduzida, à temperatura de banho-maria de 40-50 °C. O extrato seco obtido permaneceu sob refrigeração a 6°C e protegido da luz para posterior utilização. Após a técnica de rotaevaporação, obteve-se um rendimento final de 14,50 gramas do suco de uva integral e 13,27 gramas do extrato seco da uva vitória *in natura*.

FIGURA 12. Representação do modelo do Evaporador Rotatório utilizado para o processo de produção dos extratos



Outra alíquota de 300mL do volume total aplicou para a secagem em aparelho *Spray Dryer LabMaq do Brasil – LM MSD 0.5*) seguindo a metodologia adaptada e descrita por SOUZA (2013). Antes de submeter a secagem adicionou-se a goma arábica, SIGMA (5% p/v) ao volume total do extrato líquido. As condições operacionais de secagem foram: temperatura do ar de secagem de entrada 180°C e saída 50°C; pressão de atomização: 0.08 a 0.14 bar; vazão média do ar de secagem: 75.031 m³ /h; vazão média de alimentação: 0.08 L/h observadas na Figura 16.

A goma arábica atua como sistema carreador auxiliando no processo de secagem do fruto evitando que ocorra perda de amostra no próprio aparelho. Após o processo obteve-se aproximadamente 15 gramas de amostra de extrato seco de uva vitória in natura em pó. Esta ação aplicou de forma similar para o suco de uva integral liofilizado, obtendo-se um rendimento final de 14 gramas aproximadamente. Ao término, as amostras foram armazenadas em recipientes herméticos no interior de dessecadores, até o momento da realização das análises.

Figura 13: Representação do modelo do aparelho de *Spray Dryer* utilizado para secagem por atomização



5.5 AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E ESTABILIDADE

5.5.1 Avaliação das características físico-químicas e propriedades organolépticas

A estabilidade é a capacidade que o produto tem num determinado período de manter as suas propriedades (físico químicas e microbiológicas) e características (organolépticas) apresentadas após o preparo através de um procedimento padronizado (D´LEÓN, 2001).

O estudo da estabilidade das formulações fornece informações sobre o grau de estabilidade relativa de um produto nas diversas condições a que possa estar sujeito, desde a fabricação até o término da sua validade (BRASIL, 2004). As amostras foram armazenadas em recipientes de vidro transparente com tampa, devidamente identificadas. Todas as técnicas descritas foram produzidas em triplicata em cada tipo de amostra, sendo que cada triplicata foi submetida a um tipo de ambiente: temperatura ambiente $25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}$, e em refrigerador (Consul) a $-20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Todos os testes descritos constam no Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos da Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2010).

As amostras foram avaliadas de acordo com parâmetros organolépticos e físico-químicos, em periodicidade de zero, 24 horas e em 7,15,30, 60 e 90 dias em diferentes ambientes, a temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$ em temperatura ambiente, e no refrigerador a -20°C . A análise organoléptica foi efetuada através da percepção de alterações durante período determinado. As variações de cor, odor e aspecto foram observadas da seguinte maneira:

- Cor: Classificadas a partir de tons secundários
- Aspecto: Classificados como homogêneo, heterogêneo, floculado.
- Odor: Classificados como característico, azedo, suave, inodoro, nauseoso, aromático e acre.

O espectrofotômetro Varian, Modelo Cary 50, foi empregado com o objetivo de realizar as leituras de absorbâncias no comprimento de onda 510nm. Segundo Baaka et al. (2015), estes são responsáveis por indicar as leituras para os fenólicos Totais e flavonoides, respectivamente. Antes de iniciadas as leituras foi necessário ligar o equipamento e esperar que as lâmpadas estivessem aquecidas por volta de 15 a 20

min, aproximadamente. As cubetas de quartzo foram manuseadas sendo tocadas apenas na parte translúcida. Depois de habilitado, a primeira leitura foi referente ao branco da amostra, portanto o branco em questão é o solvente. Após a sua leitura zerou-se o aparelho “measuring blank”, a fim de ser descontado o valor da absorbância. Finalizado, as amostras foram colocadas na cubeta para leituras. As amostras concentradas em rotaevaporador, foram diluídas na escala de 1:50, com o resultado final da absorbância, considerou-se como fator de diluição 0,5.

5.6 OTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO DE BIOATIVOS ANTIOXIDANTES

Objetivando realizar uma otimização da metodologia para escolha do melhor método de extração a ser encapsulado, realizou-se a avaliação e quantificação dos fenólicos totais e flavonoides em duas etapas. Na primeira quantificou-se seus teores e comparando os resultados obtidos nos diferentes métodos de extração.

E para a segunda já com a metodologia de extração escolhida a partir dos resultados obtidos, foi incorporado o sistema carreador nas amostras de extrato de suco de uva integral e no extrato de uva *in natura*. Tal separação por etapas visou uma incorporação do sistema carreador a partir da técnica mais rentável.

5.6.1 Quantificação do teor de fenólicos totais

O teor de fenóis totais foi adaptado e determinado pelo método de Folin-Ciocalteu (BRASIL, 2010; SINGLETON & ROSSI, 1965). Uma solução estoque do ácido gálico de concentração 1 g.L⁻¹ em água foi preparada para sucessivas diluições. Construção de curva analítica para o ácido gálico foi realizada em concentrações de 0,1 µ.mL⁻¹ a 0,5 µ.mL⁻¹ por sucessivas diluições. A estas soluções preparadas foram adicionados 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu, seguidos de 1,5 mL de Carbonato de Sódio (Na₂CO₃) a 7,5 %. Depois de decorrido a reação por um período de aquecimento de 20 minutos a 50°C, a absorbância das amostras foi realizada em espectrofotômetro UV-Vis em 765 nm.

Uma solução estoque em metanol do extrato de 1 g.L^{-1} foi preparada para novas diluições. A partir desta $300 \mu\text{L}$ foram adicionados em balões de 10 mL seguidos da adição de $1,5 \text{ mL}$ de Carbonato de Sódio e $0,5 \text{ mL}$ do reagente de Folin- Ciocalteu. Um total de seis variedades de amostras (sendo 03 amostras de uva e 03 amostras de suco de uva integral industrializado) foram analisados para determinação do teor de fenóis sendo este expresso em mg por equivalente de ácido gálico por grama de extrato (mg EAG. g.L^{-1}). A quantificação de fenólicos totais foi realizada através de curva de calibração de ácido gálico. A equação da reta foi usada para determinar a concentração em mg de ácido gálico, onde x corresponde a concentração de ácido gálico e y corresponde a absorvância da amostra.

5.6.2 Quantificação do teor de flavonóides

A determinação do teor de flavonóides totais foi realizada através da metodologia adaptada de Dewanto et al. (2002). Para este teste, foi utilizado o mesmo extrato obtido para a análise de compostos fenólicos totais, no qual, 1 mL da amostra final foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL contendo previamente 4 mL de água destilada. Foram adicionados $0,3 \text{ mL}$ de nitrito de sódio 5% . Após exatos 5 minutos, foram adicionados $0,3 \text{ mL}$ de cloreto de alumínio 10% e após 1 minuto foram adicionados 2 mL de hidróxido de sódio 1M . O balão volumétrico foi completado com água destilada e agitado manualmente.

A absorvância foi medida a 510nm e a quantificação feita através de uma curva de calibração construída pela diluição de uma solução padrão de Quercetina (QUER) ($R^2=0,9995$). O conteúdo total de flavonoides foi expresso como mg de equivalentes de quercetina por grama de amostra.

Para determinação do teor de flavonóides totais, foi utilizado um balão volumétrico de 5 mL , no qual foi adicionado sequencialmente 2mL de água destilada, $0,5\text{mL}$ da amostra $100 \mu\text{g/mL}$ de nitrito de sódio 5% , após 6 minutos adicionou-se $100 \mu\text{g/mL}$ do cloreto de alumínio a 10% , após 5 minuto fora adicionados 1mL de hidróxido de sódio 1M . Para este teste também fora utilizado um total de seis variedades de amostras (sendo 03 amostras de uva e 03 amostras de suco de uva integral industrializado).

Completou-se o volume do balão com água destilada e homogeneizou-se manualmente. Após 30 minutos a absorvância foi medida em espectrofotômetro (*Varian Cary 50 UV/Vis*) com cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm (Beckman Coulter). O branco utilizado foi o próprio solvente (álcool etílico-PA) (LEE *et al.*, 2003). Para a construção da curva de calibração utilizou-se como padrão a quercetina nas concentrações de 0,03125, 0,625, 0,125, 0,25, 0,5 e 0,75 µg/mL. O resultado do teor de flavonóides totais foi expresso como equivalente de quercetina (mg QUE/g) e calculado por meio da construção de uma curva analítica. A equação da reta foi usada para determinar a concentração onde x corresponde a concentração de quercetina e y corresponde a absorvância.

5.7 ENCAPSULAÇÃO DO ATIVO NA CICLODEXTRINA – SISTEMA CARREADOR

Após os resultados obtidos a partir das quantificações iniciais, as amostras que apresentaram um maior teor de compostos fenólicos e teor de flavonoides, foram encapsuladas com ciclodextrina e avaliadas sua absorvância no teste de DPPH. O complexo de nanoencapsulação entre a β-ciclodextrina e o ativo foi preparado pela técnica de co-solubilização, na qual uma solução (Fase A) contendo o ativo e a ciclodextrina cristalina (Sigma-Aldric) numa proporção de 1:1 foi preparada utilizando acetona PA como solvente (100ml), e uma solução de polissorbato 80 (1ml) em água (100ml) (Fase B).

Estas soluções foram mantidas sob agitação até completa solubilização das substâncias por período equivalente a 24 horas. Após completa solubilização, a solução final foi concentrada em evaporador rotatório. O sólido resultante acondicionou-se em recipiente de vidro e mantido em temperatura ambiente (28°C) (BOMFIM *et al.*; 2016).

5.8 ANÁLISE DOS COMPOSTOS FENÓLICOS ENCAPSULADOS

Após a otimização da metodologia de extração de bioativos antioxidantes, realizou-se nova quantificação dos fenólicos totais e flavonoides utilizando os mesmos métodos

descritos anteriormente. Para todas as análises foram testadas 01 amostra do extrato de uva concentrado em rotaevaporador, 01 amostra do extrato de uva concentrado em rotaevaporador com ciclodextrina, 01 amostra do extrato de suco de uva concentrado em rotaevaporador e 01 amostra do extrato de suco de uva concentrado em rotaevaporador com ciclodextrina. A metodologia da diluição manteve-se a mesma para cada análise, bem como os valores padrões para cada teste e suas absorvâncias.

5.9 ENSAIOS DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE ATRAVÉS DO TESTE DE DPPH

Para a realização do teste de atividade antioxidante foram preparados 25,00 mL de soluções estoques das amostras de uva (extrato concentrado e extrato concentrado com ciclodextrina) e do Suco de uva integral industrializado (extrato concentrado e extrato concentrado com ciclodextrina) . Além disso preparou-se do padrão de BHT, todas na concentração final de $1.000 \mu\text{.mL}^{-1}$.

Estas soluções estoques foram diluídas para obtenção das diferentes concentrações usadas no teste, que foram $100 \mu\text{.mL}^{-1}$, $250 \mu\text{.mL}^{-1}$, $500 \mu\text{.mL}^{-1}$ e $750 \mu\text{.mL}^{-1}$. Como padrão, foi usado o butil-hidroxitolueno (BHT) e além das concentrações anteriormente descritas, também foi usada uma solução de concentração final de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Também foi preparada uma solução metanólica do DPPH na concentração de 200 mcM. O teste foi realizado em placa de ELISA contendo 96 poços. Para as amostras e o padrão BHT, foram adicionados em cada poço, 50 μL de cada solução preparada nas diferentes concentrações, e 200 $\mu\text{.mL}^{-1}$ da solução de DPPH. Para o branco foi adicionado ao poço 200 μL de solução de DPPH e 50 μL de metanol, apenas. Todas as leituras foram feitas em triplicata no momento da adição das soluções (tempo 0) e após 30 minutos. A leitura das placas foi realizada em espectrofotômetro (BioRAD) no comprimento de onda $\lambda = 517 \text{ nm}$ no período de 0 minuto e 30 minutos.

Nesse intervalo de tempo a placa foi armazenada sob o abrigo da luz. A atividade antioxidante (AA%) é calculada a partir da média das absorvâncias observadas com o branco (A_{Branco}) e as soluções contendo o DPPH mais os padrões e as amostras

(A_{Amostra}), conforme equação abaixo, e o valor desse cálculo é utilizado para construção da equação da reta que serviu para determinação do IC_{50} (CUENDET; HOSTETTMANN; POTTERAT, 2001). O IC_{50} foi calculado pela equação da reta do gráfico de concentração *versus* atividade antioxidante.

A capacidade de eliminar o radical DPPH (% de atividade antioxidante) foi calculada utilizando-se a seguinte equação. Essa fórmula indica a porcentagem de descoloração do radical DPPH.

Figura 14. Fórmula da absorvância calculada após o método do DPPH*.

$$\text{Atividade Antioxidante (\%)} = \frac{A_{\text{controle(-)}} - A_{\text{amostra}} \times 100}{A_{\text{controle(-)}}$$

Acontrole(-) = absorvância da solução de DPPH sem a amostra; Aamostra= absorvância da amostra com o DPPH. (Fonte: NASCIMENTO *et al.*, 2011).

5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados apresentados como média \pm desvio padrão. Realizou-se análise de dados não paramétricos através do teste de Kruskal – Wallis para identificar diferenças significativas entre as médias por meio do software SPSS® 2015. O nível de significância considerado para a diferença entre as médias foi de 5 % ($P < 0,05$)

6. Resultados e Discussão

6.1 AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E ESTABILIDADE

Dentre as características dos compostos fenólicos, pode-se considerar como as mais importantes a sua ação antioxidante, e a função como corante de alimentos. Sendo assim, os extratos vegetais se tornam uma alternativa para a substituição dos antioxidantes e corantes sintéticos na indústria de alimentos (MANFROI et al., 2006; PINHEIRO, 2008).

O estudo da estabilidade é utilizado para nortear o desenvolvimento de formulações e do material adequado de acondicionamento, oferecer subsídios para o aperfeiçoamento das formulações, na estimativa do prazo de validade e no auxílio do monitoramento da estabilidade microbiológica, organoléptica e físico-química, (BRASIL, 2004). O Teste de Estabilidade teve como objetivo validar os limites de estabilidade do produto e comprovar o prazo de validade estimado no teste de estabilidade acelerada.

Com base nos resultados da foi possível perceber que as amostras de uva vitória *in natura* e o suco de uva integral que foram mantidas em temperatura ambiente apresentaram maiores modificações em seu pH e em suas características organolépticas, quando comparadas com as amostras mantidas em geladeira. Tal resultado é comprovado ao observar e comparar a leitura obtida do dia 0 com a leitura do 90º dia em todos os métodos de extração. Ainda segundo os resultados das análises de temperatura ambiente, observa-se que quando comparadas separadamente, as amostras da uva vitória *in natura* apresentaram uma maior variação de pH. Isso pode ser justificado pelo teor de conservantes presentes no suco de uva integral. A avaliação destes atributos é importante para o acompanhamento da manutenção destas características com o passar do tempo, o que é um indicativo de estabilidade (BRASIL, 2003; ISAAC et al., 2008).

De acordo com a Tabela 1, foi possível identificar uma variação. A diferença observada entre as amostras pode ser pressuposta pela diferença de processamento,

bem como a variedade da uva *in natura*, quando comparada com o suco industrializado integral, além da diferença da região de seu plantio (REYES E CISNEROS-ZEVALLOS ,2007). Correlacionando as tabelas (1 e 3) os extratos em suas diferentes formas de processamento e apresentação é possível descrever que as amostras que foram mantidas em geladeira apresentaram uma maior estabilidade de pH, variando menos de um período para outro de leitura. A pele possui um valor médio de pH 5,5 este valor pode sofrer alterações em decorrências das diferentes zonas do corpo. O pH natural da pele é decorrente das secreções das glândulas apócrinas e endócrinas que acarretam à formação de uma película protetora (filme hidrolipídico) sobre toda a superfície cutânea (OLIVEIRA, 2011).

Tabela 1: Avaliação de Estabilidade das Amostras De Uva Vitoria e Suco (Temperatura Ambiente) – pH.

AMOSTRAS	DIA 0	24 HORAS	7 DIAS	14 DIAS	30 DIAS	60 DIAS	90 DIAS
Uva Vitória SD	4,6	4,6	4,5	4,5	4,6	4,3	3,9
Suco SD	3,6	3,6	3,7	3,7	3,8	3,3	2,9
Uva Rota	4,6	4,6	4,2	3,9	3,8	3,5	3,2
Suco Rota	4,3	4,3	4,1	4,1	3,9	3,7	3,5
Uva Liofilizada	4,6	4,6	4,5	4,5	4,3	4,0	3,8
Suco Liofilizado	4,5	4,5	4,3	4,2	4,0	4,0	3,8

Varição da escala de pH das diferentes amostras em temperatura ambiente

Tabela 2: Avaliação de Estabilidade das Amostras De Uva Vitoria e Suco (Temperatura Ambiente) - Características Organolépticas

AMOSTRAS	DIA 0	24 HORAS	7 DIAS	14 DIAS	30 DIAS	60 DIAS	90 DIAS
Uva Vitória SD	S.A	S.A	S.A	S.A	C.A	C.A	C.A
Suco SD	S.A	S.A	S.A	S.A	C.A	C.A	C.A
Uva Rota	S.A	S.A	S.A	S.A	C.A	C.A	C.A
Suco Rota	S.A	S.A	S.A	S.A	C.A	C.A	C.A
Uva Liofilizada	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A	C.A	C.A
Suco Liofilizado	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A	C.A	C.A

Varição das características organolépticas das diferentes amostras em geladeira. SEM ALTERAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉTICAS(SA) COM ALTERAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉTICAS (CA).

Ao analisar os resultados obtidos das amostras em geladeira, observa-se uma variação insignificante de pH e de suas características organolépticas. Tal resultado é descrito tanto para as amostras de uva *in natura*, como também na análise das amostras de suco de uva integral em todos os métodos de extração.

Ainda segundo os resultados das análises de geladeira, observa-se que quando comparadas separadamente, as amostras da uva vitória *in natura* apresentaram uma maior variação de pH. Essa diferença de variação entre as amostras de uva e suco, também foram presenciadas nas amostras em temperatura ambiente e justifica-se assim que o seu teor de conservantes mantém o seu pH e suas características organolépticas independentemente do seu métodos de extração.

Tabela 3: Avaliação de Estabilidade das Amostras De Uva Vitoria e Suco (Geladeira)- pH

AMOSTRAS	DIA 0	24 HORAS	7 DIAS	14 DIAS	30 DIAS	60 DIAS	90 DIAS
Uva Vitória SD	4,8	4,7	4,5	4,5	4,5	4,6	4,5
Suco SD	3,5	3,5	3,8	3,8	3,8	3,9	3,8
Uva Rota	4,7	4,7	4,5	4,5	4,4	4,2	4,1
Suco Rota	4,6	4,6	4,5	4,4	4,2	4,2	4,0
Uva Liofilizada	4,5	4,5	4,4	4,3	4,3	4,2	4,1
Suco Liofilizado	4,6	4,6	4,4	4,4	4,4	4,2	4,2

Variação do pH das diferentes amostras em geladeira.

Tabela 4: Avaliação de Estabilidade das Amostras De Uva Vitoria e Suco (Geladeira)- Características Organolépticas

AMOSTRAS	DIA 0	24 HORAS	7 DIAS	14 DIAS	30 DIAS	60 DIAS	90 DIAS
Uva Vitória SD	S.A.	S.A.	S.A.	S.A.	S.A.	S.A.	C.A
Suco SD	S.A.	S.A.	S.A.	S.A.	S.A.	S.A.	C.A
Uva Rota	S.A.	S.A.	S.A.	S.A.	S.A.	C.A	C.A
Suco Rota	S.A.	S.A.	S.A.	S.A.	S.A.	S.A.	C.A
Uva Liofilizada	S.A.	S.A.	S.A.	S.A.	S.A.	S.A.	C.A
Suco Liofilizado	S.A.	S.A.	S.A.	S.A.	S.A.	S.A.	C.A

Variação das características organolépticas das diferentes amostras em geladeira. SEM ALTERAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉTICAS(SA) COM ALTERAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉTICAS (CA).

Os compostos bioativos são instáveis, podendo ser degradados frente a diversas condições comumente encontradas no processamento e no armazenamento de alimentos, tais como aplicação de altas temperaturas, congelamento, pH, umidade, presença de luz, oxigênio, enzimas oxidativas, metais e íons (BAKOWSKA, KUCHARSKA E OSZMIANSKI, 2003; FANG e BHANDARI, 2011), ou condições encontradas no trato gastrointestinal, como pH, enzimas e presença de outros nutrientes (SERRANO-CRUZ et al., 2013). Os compostos bioativos exibem decomposição significativa frente a altas temperaturas (Hamama e Nawar, 1991), sendo que a proporção e a duração do aquecimento podem influenciar a degradação.

Sabe-se que um rápido aquecimento pode facilitar a extração de alguns compostos, como exemplo os compostos fenólicos. Além disso, podem inativar enzimas oxidativas como a polifenoloxidase e a peroxidase, que degradam os polifenóis. Porém LARRAURI, RUPÉREZ E SAURA-CALIXTO(1997) elucidaram o efeito das temperaturas de secagem na estabilidade dos polifenóis e na atividade antioxidante de bagaço de casca de uva tinta. Eles observaram que quando utilizada temperatura de 100 e 140°C houve uma redução significativa nos polifenóis totais (18,6 e 32,6%) e de taninos condensados (11,1 e 16,6%), além de observarem um decréscimo da atividade antioxidante em 28 e 50%, respectivamente.

Em contra partida, SÓLYOM et al. (2014) observaram que utilizando temperatura de 150°C na extração de antioxidantes da uva é possível preservar pelo menos 90% dos compostos ativos, desde que o tempo em que o produto seja mantido a essa temperatura não seja superior a 1 minuto. Por outro lado, CRUZ et al. (2007) avaliaram a estabilidade térmica dos polifenóis do bagaço de uva vermelha frente a diferentes temperaturas e tempos de aquecimento, e observaram que houve 28% de perda de compostos fenólicos quando utilizado aquecimento de 200°C por 120 minutos.

Em relação às baixas temperaturas, diversos estudos demonstram que ocorre uma redução no teor de compostos fenólicos, entretanto, alguns são mais degradados que outros, e sendo assim, o percentual de degradação vai depender da composição de polifenóis presentes no fruto (ANCOS, GONZÁLES E CANO, 2000; CHAOVANALIKIT E WROLSTAD, 2004; TURKBEN et al., 2010). Quanto ao pH, AMENDOLA, FAVERI E SPIGNO (2010) avaliaram a estabilidade de extrato de uva e de ácido gálico em quatro diferentes pHs (3, 5, 7 e 9) e observaram perdas maiores de polifenóis totais e atividade antioxidante nos pHs 7 e 9. REYES E CISNEROS-ZEVALLOS (2007)

avaliaram a estabilidade de antocianinas em extrato e observaram que a estabilidade foi maior em menores valores de pHs.

O conteúdo de água também pode influenciar o teor de compostos fenólicos, entretanto, há controvérsias em relação a isso. Por outro lado, JIMÉNEZ et al. (2012) observaram que em temperaturas acima de 100°C a redução da atividade de água aumenta em 4 vezes a degradação de compostos fenólicos. Além disso, a presença de luz e oxigênio são outros fatores que provocam a degradação destes compostos.

A natureza insaturada dos polifenóis torna as moléculas suscetíveis ao oxigênio molecular. GONZÁLES-BARRIO et al. (2005) comprovaram a instabilidade de antocianinas frente a presença de luz. Já YORUK E MARSHALL, (2003) avaliaram o efeito da adição de oxigênio em vinhos, e observaram que isto resultou em redução no teor de fenóis totais e aumento na concentração de compostos poliméricos de coloração vermelha. BENÍTEZ et al. (2006) observaram decréscimo no teor de polifenóis totais quando vinhos foram submetidos à irradiação por luz UV-visível e alta temperatura (45°C).

Por outro lado, os compostos fenólicos são substratos para enzimas oxidativas como a polifenoloxidase (PPO) (GONZÁLES-BARRIO et al., 2005). A PPO é amplamente distribuída em frutas e vegetais, que, na presença de oxigênio, catalisa a oxidação de monofenóis e o-difenóis em o-quinonas, que posteriormente vão ser condensadas ou polimerizadas para formar compostos de coloração marrom denominados melaninas (DUANGMAL E APENTEN, 1999; MATHEW E PARPIA, 1971; YORUK E MARSHALL, 2003). Como observado, a estabilidade dos fenóis está relacionada com diversos parâmetros, e sendo assim, pode alterar de acordo com as outras condições presentes em um mesmo sistema. O presente teste pode evidenciar que o método de extração bem como a variedade da uva podem apresentar uma maior estabilidade e uma menor variação do pH e de suas características organolépticas.

Acredita-se que os maiores valores de pH encontrados no final do período de armazenamento, os 90 dias, sejam consequência dos menores teores de ácidos orgânicos presentes nas amostras de uva in natura e suco, segundo Rizzon, Miele e Meneguzzo, (2000) esses parâmetros estão frequentemente interligados. A acidez em uvas é atribuída, principalmente, aos ácidos orgânicos que se encontram dissolvidos nos vacúolos das células, tanto na forma livre como na combinada, como sais, ésteres,

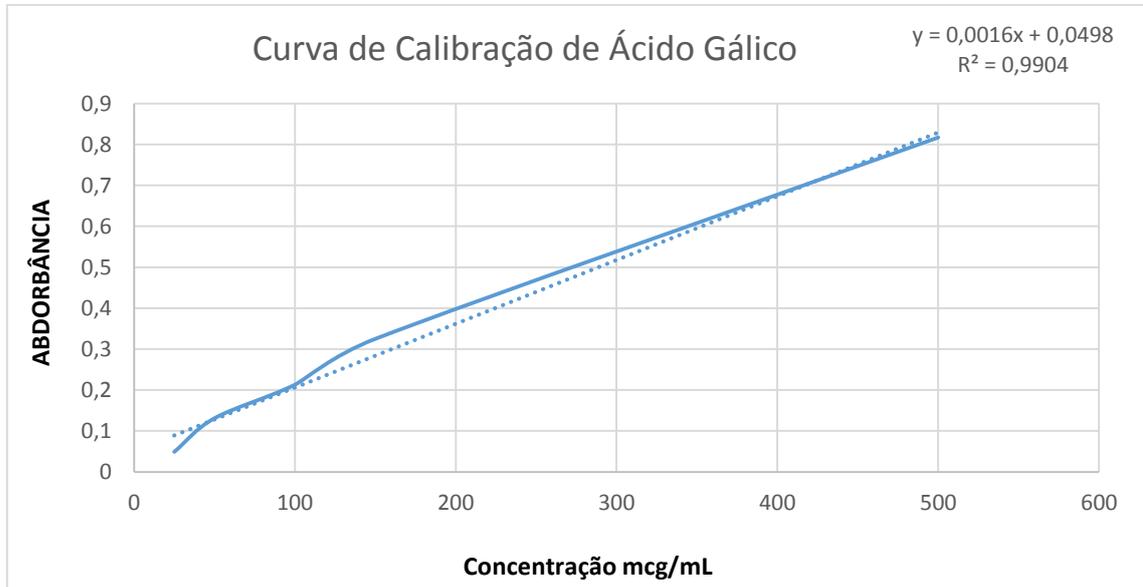
glicosídeos, etc. Descreve-se que alguns ácidos orgânicos não só contribuem para a acidez, como também para o aroma característico, porque alguns componentes são voláteis (CHITARRA e CHITARRA, 2005).

6.2 OTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO DE BIOATIVOS ANTIOXIDANTES

6.2.1 Fenólicos totais

Os compostos fenólicos, presentes nas frutas e hortaliças, são um dos principais responsáveis pela atividade antioxidante destas. Seu conteúdo final pode estar influenciado por fatores como: a maturação, a espécie, práticas de cultivo, origem geográfica, estágio de crescimento, condições de colheita e processo de armazenamento (Kim et al., 2013). Comparando a eficiência de extração para as diferentes amostras foi possível observar que a forma de obtenção do extrato influencia no teor de compostos fenólicos da amostra final. Isto é comprovado nos resultados dos testes de Fenólicos totais, Flavonóides, onde a partir da análise espectrofotométrica comparados com o padrão de cada teste, verificou-se que o método de extração através do Rotaevaporador mantém os teores de compostos bioativos mais elevados.

Os valores das médias e desvio padrão dos fenólicos totais da uva in natura e do sucos estão apresentados na Tabela 5. A concentração de fenólicos totais da uva comparada com o suco apresentam diferenças significativas, onde a uva concentrada no rotaevaporador apresentou a maior média. Os fenólicos totais foram dosados pelo método de, Folin-Ciocalteu (BRASIL, 2010; SINGLETON & ROSSI, 1965). Para a quantificação de fenóis totais das amostras foi construída uma curva padrão preparada com ácido gálico (Sigma, Brasil) e expressa como mg equivalentes de ácido gálico (EAG) por mililitro da amostra. O método proposto foi utilizado para a determinação de flavonóides totais. Seguindo o método descrito para a obtenção da curva de calibração, a leitura das soluções foi realizada em triplicata no espectrofotômetro, onde se obtiveram os valores em média de absorbância que permitiram confeccionar a seguinte curva de calibração.

Figura 15. Curva de calibração de Ácido Gálico

Valores de Branco = 0,000A / Valores Expressos em mcg / mL

Tabela 5: Resultado da quantificação do teor de Fenólicos Totais das amostras de Uva in natura e Suco de uva integral industrializado em seus diferentes tipos de metodologia de extração.

AMOSTRAS	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	VALOR MÉDIO
Uva Vitória SD	399,6 (A)	3,6	399,6 ± 3,6
Suco SD	8,2 (A)	0,2	8,2 ± 0,2
Uva Rota	1597,5 (A)	6,2	1597,5 ± 6,2
Suco Rota	840,2 (A)	9,5	840,2 ± 9,5
Uva Liofilizada	1257,9 (A)	9,5	1257,9 ± 9,5
Suco Liofilizado	522,5 (A)	6,3	522,5 ± 6,3

Valores de Branco = 0,000A / Valores Expressos em mg / \sum AG. / (A) = Absorbância. Apresentada a média das absorbâncias

Segundo Belitz, Grosch e Schieberle (2009), a composição química da uva varia de acordo com a composição do solo onde a fruta foi cultivada, a localização geográfica, o estágio de maturação na colheita, e as diferenças intrínsecas entre as variedades de uva tintas, *Vitis vinífera* e *Vitis labrusca*. Além disso, a uva, também pode apresentar diferenças quanto a sua composição dependendo de como é o processo industrial na etapa de prensagem e sua eficiência, para o caso do suco integral industrializado. Desta forma, a partir dos resultados obtidos, algumas diferenças foram percebidas entre as amostras de uva (RIBEIRO, 2016)

A quantificação de fenólicos totais foi realizada através de curva de calibração de ácido gálico, representada pelo gráfico 1 e tabela 5. A equação da reta $y = 0,0016x + 0,0498$ foi usada para determinar a concentração em mg de ácido gálico onde x corresponde a concentração de ácido gálico e y corresponde a absorvância da amostra.

O método de Folin-Ciocalteu permitiu quantificar compostos fenólicos presentes nas amostras, os quais têm a capacidade de ligar-se a radicais livres, inibindo processos oxidativos.

Os resultados foram obtidos por meio da análise espectrofotométrica para a determinação do teor de fenólicos totais nos lipossomas e extratos expressos em mg equivalente de ácido gálico mg/mL, quanto maior o teor equivalente em ácido gálico (mg AG g^{-1}) encontrado, maior a porcentagem de fenólicos totais.

De acordo com os resultados fora possível observar que, as amostras de uva in natura apresentaram teores de fenólicos totais superiores a $399,6 \text{ mg} / \sum\text{AG}$. Quando comparadas entre si e avaliando apenas o método de extração o extrato da uva in natura obtido pelo método da rotaevaporação apresentou resultados mais elevados quando comparados com os demais métodos, sendo o teor de fenólicos totais da Uva Rota de $1597,5 \text{ mg} / \sum\text{AG}$.

O resultado do teor de fenólicos do Suco de Uva Integral corrobora com o método de extração da Uva in natura. Seus níveis de compostos fenólicos totais também se apresentaram mais elevados no método de extração da rotaevaporação, apresentando $840,2 \text{ mg} / \sum\text{AG}$ de fenólicos totais, evidenciando assim que o método de Spray Dryer não seria uma escolha ideal para o estudo visto que apresentou apenas $8,2 \text{ mg} / \sum\text{AG}$ de fenólicos totais no Suco de Uva Integral industrializado.

As diferenças entre os resultados dos extratos são esperadas uma vez que em uvas o perfil de compostos fenólicos é variável em diferentes cultivares, podendo esse valor ser alterado por diferentes respostas biológicas (ABE *et al.*, 2013).

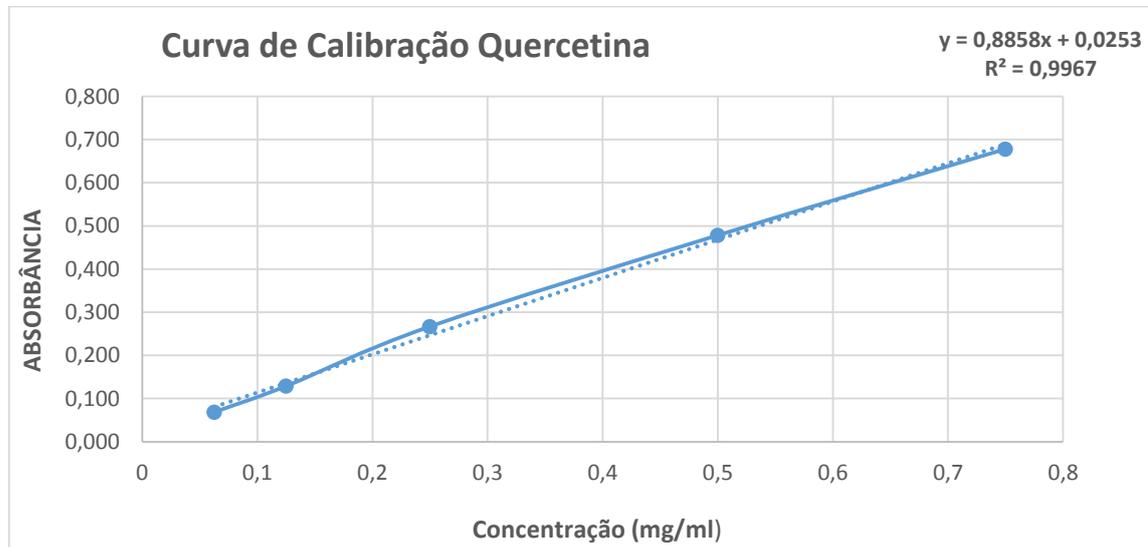
O teor de compostos fenólicos dos extratos da uva obtido nesse trabalho foi superior aos obtidos por Scher *et al.*, (2010) e Bussolo e Thomé (2008) que obtiveram respectivamente 14,80 e 24,93 mg/mL de compostos fenólicos em extrato de uva.

Ao efetuar uma comparação entre as duas amostras, Uva *in natura* e Suco de Uva Integral Industrializado, ambas obtidas através do método de extração da rotaevaporação, a uva *in natura* apresentou quase o dobro de teor de fenólicos totais em comparação ao suco de uva integral industrializado.

6.2.2 Flavonóides

Os flavonoides são uma classe de metabólitos secundários vegetais de natureza fenólica, que possuem notável capacidade antioxidante. As Catequinas, epicatequinas e quercetinas, por exemplo, tem demonstrado alta capacidade antioxidante e inibição da proliferação celular (RIBEIRO, 2016). Estão presentes, principalmente, nas cascas e sementes de uvas (MEYER *et al.*, 1997). Segundo Cheng *et al.* (2012), o tipo de solvente é um fator determinante para a eficácia do processo de extração de compostos fenólicos. Além disso, a utilização de solventes com diferentes polaridades possibilita a extração de compostos polares (solvente aquoso) ou apolares (solvente etanólico). Desta forma, uma solução extratora hidroalcoólica é capaz de carregar tanto compostos polares quanto apolares, significando uma vantagem na extração (SALDANHA, 2005; CHAICOUSKI *et al.*, 2014). A quantificação dos flavonoides foi realizada através de curva de calibração da quercetina, representada pela Figura 19.

A equação da reta $y = 0,8858x + 0,0253$, foi usada para determinar a concentração em mg de quercetina, onde x corresponde a concentração de quercetina e y corresponde a absorbância da amostra. Ao relacionarmos os resultados obtidos na Figura 19 e compararmos com a tabela 6 é possível conceber que houve diferença no teor de flavonoides em todas as amostras. Os resultados foram expressos como equivalentes de quercetina (QUER) por grama da amostra.

Figura 16. Curva de Calibração da Quercetina

Valores de Branco = 0,000A .Flavonóides totais expressos em mg^{-1} .

Avaliando a composição das variedades analisadas, os valores mais expressivos de flavonoides correspondem às amostras que passaram pelo método de extração de rotaevaporação, tanto para a Uva in natura, quanto para o Suco de uva integral industrializado. A temperatura, utilizada em suas diferentes formas de obtenção dos extratos, pode ter influência no resultado obtido (PIES, 2017).

Em ensaios com temperaturas de 35°C o conteúdo de fenólicos totais foi maior se comparado as extrações a 55°C , indicando degradação térmica dos compostos em estudo (MEIRELES, 2011). Uma possível explicação para este comportamento é a proximidade do ponto crítico na temperatura de 30°C onde pequenas alterações nas condições de operação provocam variações na densidade do solvente, e conseqüentemente nos valores de solubilidade e rendimento. Essa variação de temperatura pode indicar uma maior concentração ou uma diminuição de compostos antioxidantes.

Tabela 6: Resultado da quantificação do teor de Flavonóides das amostras de Uva in natura e Suco de uva integral industrializado em seus diferentes tipos de metodologia de extração.

AMOSTRAS	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	VALOR MÉDIO
Uva Vitória SD	244,4 (A)	15,6	244,4 ± 15,6
Suco SD	3,7 (A)	0,1	3,7 ± 0,1
Uva Rota	1620,4 (A)	9,5	1620,4 ± 9,5
Suco Rota	1029,8 (A)	11,0	1029,8 ± 11,0
Uva Liofilizada	535,0 (A)	12,5	535,0 ± 12,5
Suco Liofilizado	522,5 (A)	6,3	522,5 ± 6,3

Valores de Branco = 0,000A / Valores Expressos em mcg / Σ QUER/ (A) = Absorbância. Apresentada a média das absorbâncias

Em uvas o perfil de flavonóides é variável em decorrência dos distintos cultivares e das respostas biológicas (RIBEIRO, 2016). Os resíduos industriais gerados pela indústria de sucos e vinhos retêm compostos fenólicos (O'BYRNE et al., 2002). Monrad (2010), cita os flavonóides como os principais compostos fenólicos presentes nesse resíduo. Isto justifica assim a diferença no teor de flavonoides da uva in natura, esta quando comparada ao suco de uva integral industrializado.

De acordo com os dados obtidos, o teor de flavonoides da uva in natura em seus três métodos de extração apresentou valores superiores quando comparados aos resultados do suco. Quando comparados os métodos de extração observa-se que as amostras que passaram pelo processo de rotaevaporação apresentaram um maior teor maior de flavonoides. Tal resultado pode ser comprovado tanto para as amostras de uva in natura $1620,4 \pm 9,5$, quanto para o suco $1029,8 \pm 11,0$.

6.3 RESULTADOS DA OTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO DE BIOATIVOS ANTIOXIDANTES E INCORPORAÇÃO COM CICLODEXTRINA

6.3.1 Fenólicos Totais e Flavonóides

Após realizada a primeira análise farmacognóstica com os extratos da Uva *in natura* e do Suco Integral nos seus diferentes tipos de extração, as amostras que apresentaram melhores resultados foram selecionadas para então serem encapsuladas. Após o encapsulamento, realizou-se uma nova análise dos extratos objetivando comparar os resultados obtidos anteriormente com os resultados após o encapsulamento.

O extrato de uva *in natura* encapsulada apresentou um teor de compostos fenólicos de $640,0 \pm 180,3$, esse valor foi inferior aos $1000,7 \pm 3,0$ da uva sem a ciclodextrina. De forma similar foi possível observar que o teor de compostos fenólicos do suco de uva integral com a ciclodextrina apresentou valores inferiores $556,7 \pm 152,8$, quando comparados com os valores dos fenólicos presentes no suco sem o sistema carreador $1359,0 \pm 10,0$.

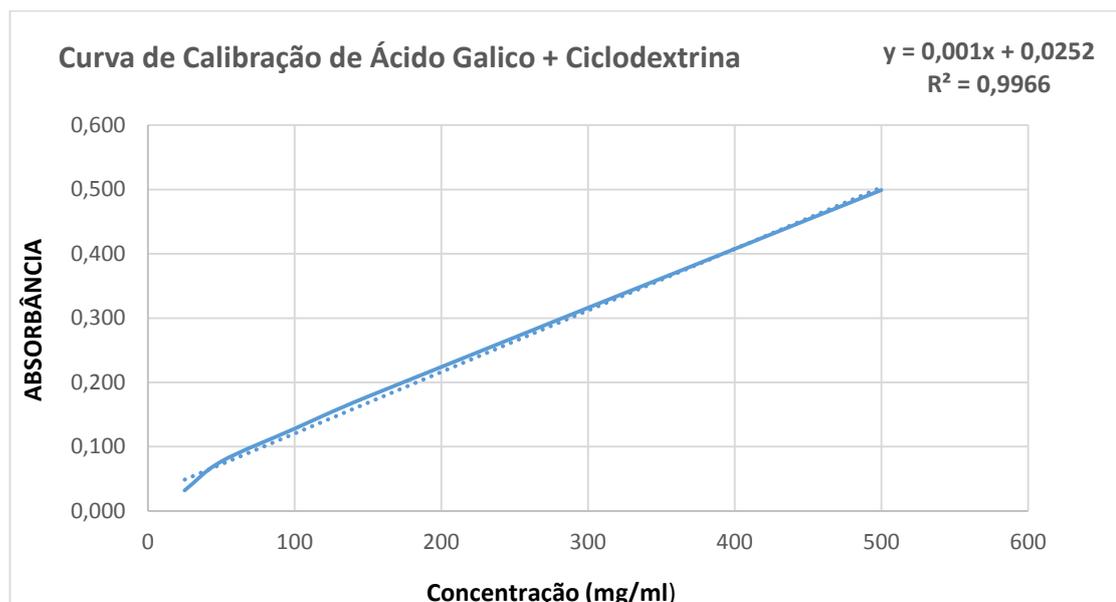
Ao efetuar uma comparação das amostras em sua forma pura com as amostras incorporadas com os sistemas carreadores, observou-se que a amostra da uva *in natura* sem a ciclodextrina apresentou teores mais elevados de flavonoides, sendo $56,6 \pm 0,7$ sem o sistema carreador e $3,1 \pm 0,5$, com a ciclodextrina. O mesmo ocorre com a amostra de suco de uva integral industrializado, onde analisa-se que o suco com a ciclodextrina apresentou valores inferiores de flavonoides $1,5 \pm 0,2$. Ainda, ao comparar as amostras entre si, é possível averiguar que após a encapsulação todos os extratos obtiveram teores de flavonóides inferiores e que, a uva *in natura* apresentou maiores teores $56,6 \pm 0,7$ quando comparada com o suco $25,5 \pm 0,2$.

Os valores demonstraram que o teor de fenólicos totais e flavonoides nas amostras encapsuladas tiveram valores inferiores quando comparadas com as amostras sem o sistema carreador. Uma possível explicação a esse fato, tem como base o solvente utilizado na formação das nanopartículas. Estes sistemas encapsulados contêm

substâncias que são solubilizadas no solvente (água) do sistema escolhido e ao reagir com outro solvente pode ter acarretado em um menor teor de compostos fenólicos e flavonoides (XAVIER, 2016). Estágios adicionais podem ser necessários para purificar o isolado e remover substâncias fenólicas e não-fenólicas indesejáveis. Para um posterior ensaio é interessante a utilização de diferentes solventes, visto que o solvente empregado na obtenção e/ou diluição da amostra influencia diretamente no resultado obtido.

Na literatura, os flavonoides são apontados como antioxidantes efetivos devido a sua habilidade de sequestrar radicais livres, atuando como doadores de hidrogênio, e quelar metais, protegendo assim os tecidos dos radicais livres e da peroxidação lipídica, reduzindo o potencial de ocorrência de doenças crônico-degenerativas (RIBEIRO, 2016). Uma nova leitura foi realizada e seguiu-se o método padrão para a obtenção da curva de calibração. Novamente a leitura das soluções foi realizada em triplicata no espectrofotômetro, e obteve-se os valores em média de absorbância permitindo assim realizar a curva de calibração já com o sistema carreador.

Figura 17. Curva de calibração de Ácido Gálico com o complexo de encapsulação (Ciclodextrina)



Valores de Branco = 0,000A / Valores Expressos em mcg / mL

A partir das análises obtidas, observa-se que as amostras com o sistema carreador mantiveram seus teores tanto de fenólicos totais quanto de flavonoides quantitativamente inferiores quando comparados aos resultados obtidos nas amostras sem a incorporação da ciclodextrina. Nota-se essa diferença ao comparar o teor de fenólicos totais da uva in natura sem o complexo carreador $1000,7 \pm 3,0$, com a amostra tendo a adição da ciclodextrina $640,0 \pm 180,3$.

A membrana que engloba o sistema carreador tem como principal característica proteger o ativo o qual será liberado na via transdérmica, mantendo-o estável. As ciclodextrinas e seus derivados hidrofílicos aumentam a solubilidade e estabilidade de fármacos em preparações dérmicas tais como soluções aquosas e emulsões. Além disso, as ciclodextrinas e especialmente os seus derivados hidrofóbicos, podem modificar a permeabilidade dos fármacos através da pele, a bioconversão de fármacos nos tecidos alvo e a irritação tópica causada por alguns fármacos (VEIGA, 2002). O não rompimento desta membrana pode justificar a diferença obtida entre as amostras encapsuladas e as amostras sem a ciclodextrina.

Tabela 7: Resultado da quantificação do teor de Fenólicos Totais das amostras de Uva in natura e Suco de uva integral industrializado após incorporação do sistema carreador (Ciclodextrina)

AMOSTRAS	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	VALOR MÉDIO
Uva Rota	1000,7 (A)	3,0	$1000,7 \pm 3,0$
Uva Rota + CICLODEXTRINA	640,0 (A)	180,3	$640,0 \pm 180,3$
Suco Rota	1359,0 (A)	10,0	$1359,0 \pm 10,0$
Suco Rota + CICLODEXTRINA	556,7 (A)	152,8	$556,7 \pm 152,8$

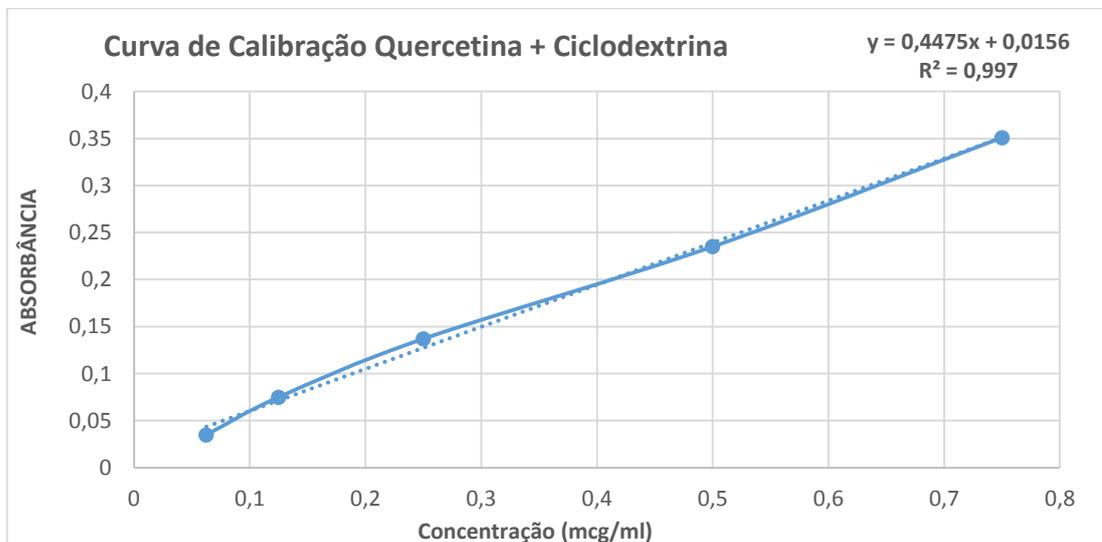
Valores de Branco = 0,000A / Valores Expressos em mcg / \sum QUER / (A) = Absorbância. Apresentada a média das absorbâncias

Tal diferença é comprovada comparando o resultados obtidos nas *Tabelas 7* com os dados da *Tabela 8*. É possível conceber que novamente houve diferença no teor de fenólicos totais e flavonóides em todas as amostras. Os resultados dos fenólicos

totais e dos flavonóides foram submetidos ao teste estatístico pelo método de Kruskal-Wallis, sendo possível aferir que não houve diferença estatística entre as amostras encapsuladas. Entretanto, quando comparadas as amostras sem o sistema de complexação evidencia-se que a amostra de uva in natura apresentou maior teor de fenólicos totais e flavonoides que o suco. A encapsulação molecular consiste na substituição das moléculas de água, que possuem elevada entalpia, por moléculas hóspedes adequadas (GUEDES et al., 2008).

Trata-se de um processo energeticamente viável por promover uma alteração favorável de entalpia, aumento de entropia e redução da energia total do sistema, estes fatores contribuem para o aumento da estabilidade do complexo formado (SAENGER, 1980; SZEJTLI, 1998). Interações eletrostáticas de Van der Waals, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio, também contribuem para formação e estabilização dos complexos de inclusão da ciclodextrina.

Figura 18. Curva de calibração da Quercetina com o complexo de encapsulação (ciclodextrina).



Valores de Branco = 0,000A .Flavonóides totais expressos em mg^{-1} .

Estudos descrevem que os flavonóides apresentam efeito benéfico a saúde, tais como: ação antioxidante, eliminação de radicais livres, ação anticâncer, atividade anti viral e ação antialérgica. (MANOEL, 2016).

Pode prever-se que, se a absorção de um fármaco é limitada pela sua solubilidade, em vez da permeabilidade, a utilização de potenciadores de solubilidade, como a ciclodextrina, aumentando assim a absorção. Okano et al., (2001) elucida ainda que, a cavidade interna da ciclodextrina pode atuar de diversas maneiras, sendo uma delas promover a proteção do estado excitatório de uma molécula flavonóide, evitando desta forma possíveis colisões com as moléculas de água no interior da solução.

Tabela 08: Resultado da quantificação do teor de Flavonóides das amostras de Uva in natura e Suco de uva integral industrializado após incorporação do sistema carreador (Ciclodextrina)

AMOSTRAS	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	VALOR MÉDIO
Uva Rota	56,6 (A)	0,7	56,6 ± 0,7
Uva Rota + CICLODEXTRINA	3,1 (A)	0,5	3,1 ± 0,5
Suco Rota	25,5 (A)	0,2	25,5 ± 0,2
Suco Rota + CICLODEXTRINA	1,5 (A)	0,2	1,5 ± 0,2

Valores de Branco = 0,000A / Valores Expressos em mcg / $\sum AG./ (A)$ = Absorbância. Apresentada a média das absorbâncias

Os flavonóides apresentam importantes propriedades farmacológicas, porém baixa solubilidade. Em decorrência deste fator limitante, existem muitos trabalhos na literatura que estudam o aumento da solubilidade destes em ciclodextrina (TOMMASINI *et al.*, 2004). Esta alternativa mostra-se muito interessante para solucionar os problemas encontrados na administração de fármacos hidrofóbicos em água.

A complexação de fármacos com as ciclodextrinas melhoram sua solubilidade em água, a velocidade de dissolução, a estabilidade química e a biodisponibilidade. Porém sua eficiência depende fundamentalmente de suas estruturas e da habilidade do fármaco alcançar e interagir com o alvo biológico (GUZZO, 2007). Neste caso o resultado obtido pode ter sido influenciado diretamente tanto pela associação do

sistema carreador com o ativo, quanto com o solvente que formou o sistema de complexação.

6.4 ENSAIO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE COM A CICLODEXTRINA

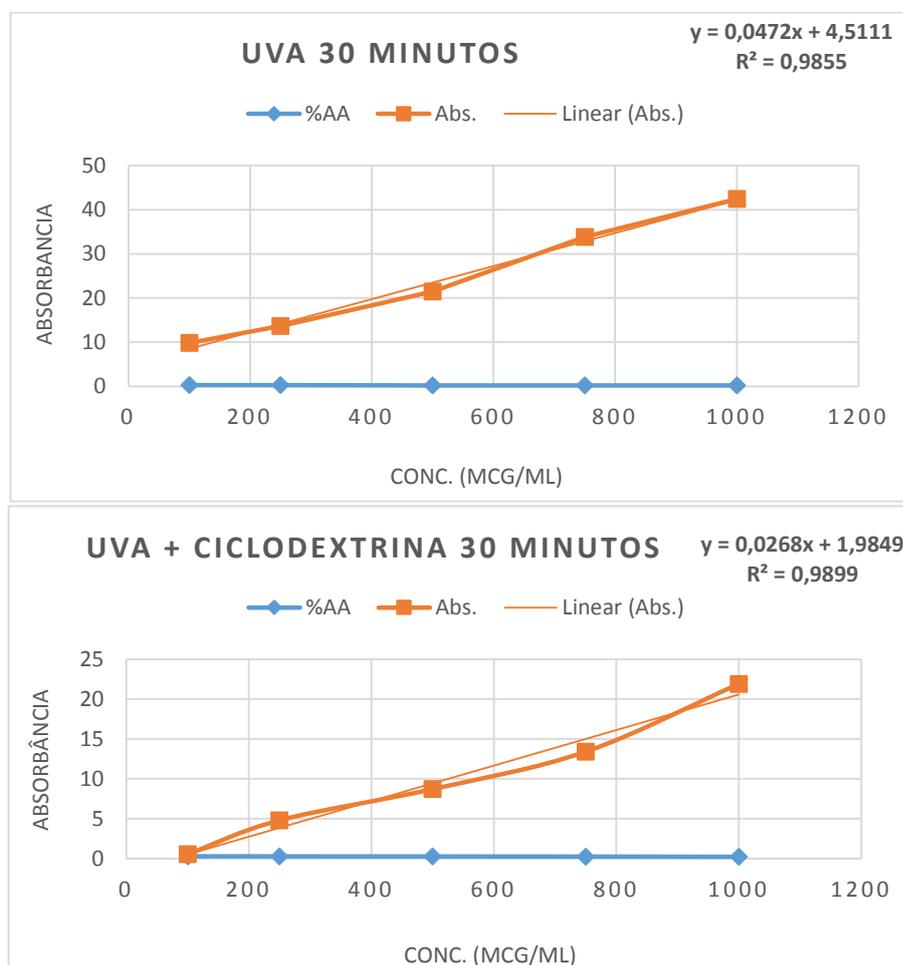
O ensaio com o DPPH é baseado na perda da intensidade da cor da solução púrpura do radical estável DPPH*, após a reação com um composto antirradicalar (AOH). O DPPH é um radical livre, pois apresenta um elétron não emparelhado, com absorção na região de leitura de sua absorbância (517 nm). Ao se misturar com uma substância capaz de doar hidrogênio, o DPPH reage e vai para sua forma reduzida, passando da cor púrpura para a castanha (CARVALHO, 2016). Os materiais de revestimento do sistema carreador, a ciclodextrina, que são basicamente materiais capazes de formar película, podem ser selecionados a partir de uma grande variedade de polímeros naturais e sintéticos, de acordo com as características desejadas para as microcápsulas (POSHADRI E KUNA, 2010). Alguns dos materiais utilizados são proteínas, lipídios e carboidratos, tais como amidos, gomas e celulosas (UMER et al., 2012).

Realizou-se o processo de complexação das amostras da uva *in natura* e do suco integral industrializado a Beta Ciclodextrina (β -CD) em diferentes proporções, para que fosse avaliada a amostra com melhor rendimento e que apresentasse melhores características frente aos métodos de caracterização espectroscópicos utilizados, para estudos farmacológicos posteriores. Os resultados obtidos para o método do DPPH foi expresso através do cálculo da concentração inibitória, cujo valor representa a quantidade de antioxidante necessária para diminuir a concentração inicial do reagente, o DPPH em 50%. Utilizou-se diferentes concentrações para se obter um intervalo de absorbância de modo que seja possível verificar a reação (CARVALHO, 2016).

Foram comparadas as amostras de Uva *in natura* (uva vitória) com e sem o sistema carreador após 30 minutos de reação. É possível perceber que, a partir do resultado do IC50 da uva a mesma apresentou uma maior atividade antioxidante, quando comparada sua amostra com o sistema carreador. No estudo com frutas realizado por

Murcia et. al., (2001) os autores concluíram que as frutas tropicais possuem boa atividade antioxidante, quanto ao sequestro das espécies reativas de oxigênio. Tal atividade pode ser observada na Figura 19 abaixo. Esta ratifica o resultado da reação entre o DPPH e a uva in natura, com e sem a ciclodextrina.

Figura 19. Resultado da análise da atividade antioxidante da amostra de uva in natura com e sem a ciclodextrina após 30 minutos de reação.



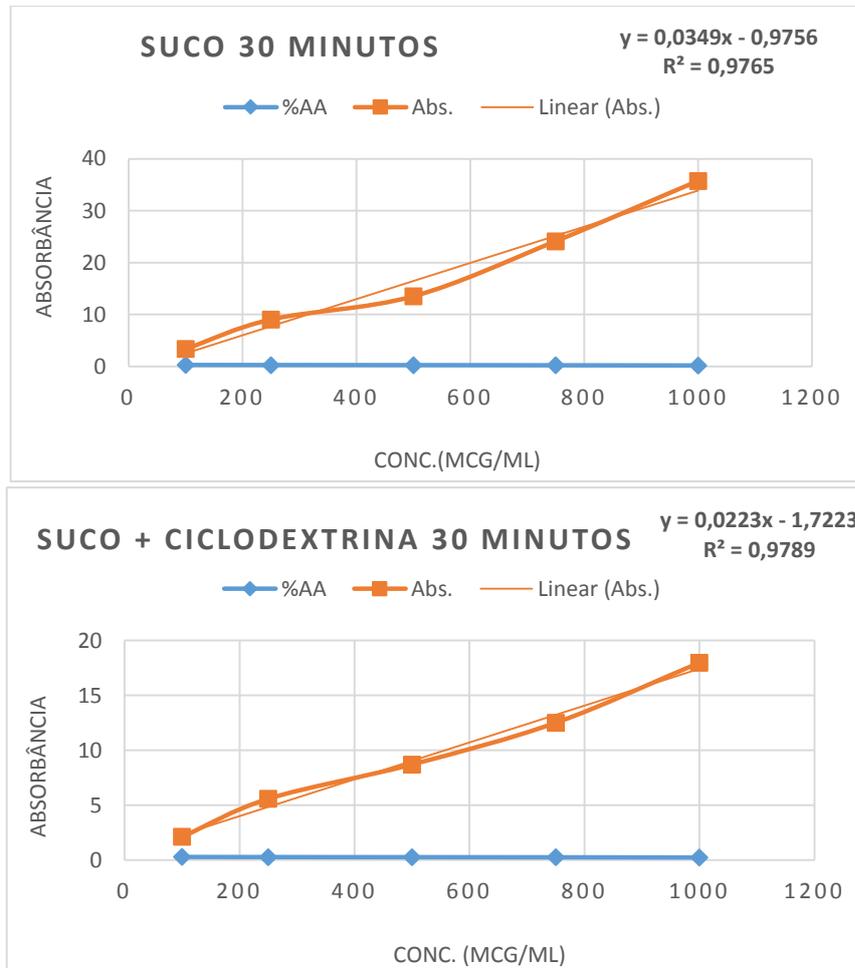
O mesmo é observado no resultado do suco de uva integral industrializado e com o padrão (BHT). Ambos também apresentaram um menor IC50, ou seja uma maior atividade antioxidante, sem a adição do sistema carreador.

Quando comparadas as amostras de uva e suco, é possível verificar que o valor do IC50 da uva *in natura* representou uma maior atividade antioxidante. Isso pode ser justificado tanto pela variedade da uva, quanto pela quantidade de compostos químicos presentes no suco, o que pode ter interferido no resultado final do DPPH. Munõs-Espada et al., (2014) avaliaram as cultivares de *Vitis vinifera*, e observaram uma associação positiva entre o conteúdo de flavonóides e a capacidade antioxidante pelo método de sequestro de radicais livres do DPPH.

RIBEIRO (2016), corrobora e descreve que a capacidade antioxidante pode estar relacionada com o teor de flavonóides das uvas, onde uma variação no perfil dos compostos fenólicos pode resultar em diferentes respostas biológicas e apesar das antocianinas representarem os constituintes potenciais, outros compostos podem estar agindo sinergicamente, contribuindo para os efeitos benéficos associados ao consumo de uvas e seus derivados.

Valores menores de IC50 indicam amostras com atividade antioxidante superior a extratos com IC50 maiores. A amostra de uva *in natura* sem a ciclodextrina apresentou um valor de IC50 (963,74) menor quando comparadas com as demais amostras testadas, possuindo assim forte capacidade para capturar radicais livres. Quando comparadas estatisticamente as amostras com o sistema carreador, ainda que a uva (1791,60) tenha apresentado um percentual de IC50 inferior ao suco (2164,91), observou-se que não houve diferença significativa entre as amostras quando avaliados as porcentagens de inibição de 50 % do radical DPPH* (IC50 %). Os maiores teores de fenólicos foram verificados nas amostras de uva *in natura*, que também apresentaram elevados índices de atividade antioxidante. As uvas contêm lipídios, proteínas, carboidratos e cerca de 5 a 8 % de polifenóis, dependendo da sua variedade. Por esta razão, extratos de uva *in natura* são considerados os antioxidantes mais potentes (CHEDEA et al., 2010).

Figura 20. Resultado da análise da atividade antioxidante da amostra de suco de uva integral industrializado com e sem a ciclodextrina após 30 minutos de reação.



Ao realizar uma comparação do potencial antioxidante do padrão BHT (676,72 sem ciclodextrina) e (1291,51 com ciclodextrina), a amostra que mais se aproximou dos valores de IC50 do padrão foi a uva *in natura*, evidenciando assim uma maior capacidade de capturar radicais livres. Ainda que a amostra de suco tenha apresentado um poder de sequestro (1401,71 sem ciclo) e (2164,91 com ciclodextrina), ao confrontar com o padrão, a mesma não apresentou resultados estatisticamente significantes.

Figura 21. Resultado da análise da atividade antioxidante do padrão BHT com e sem a ciclodextrina após 30 minutos de reação.

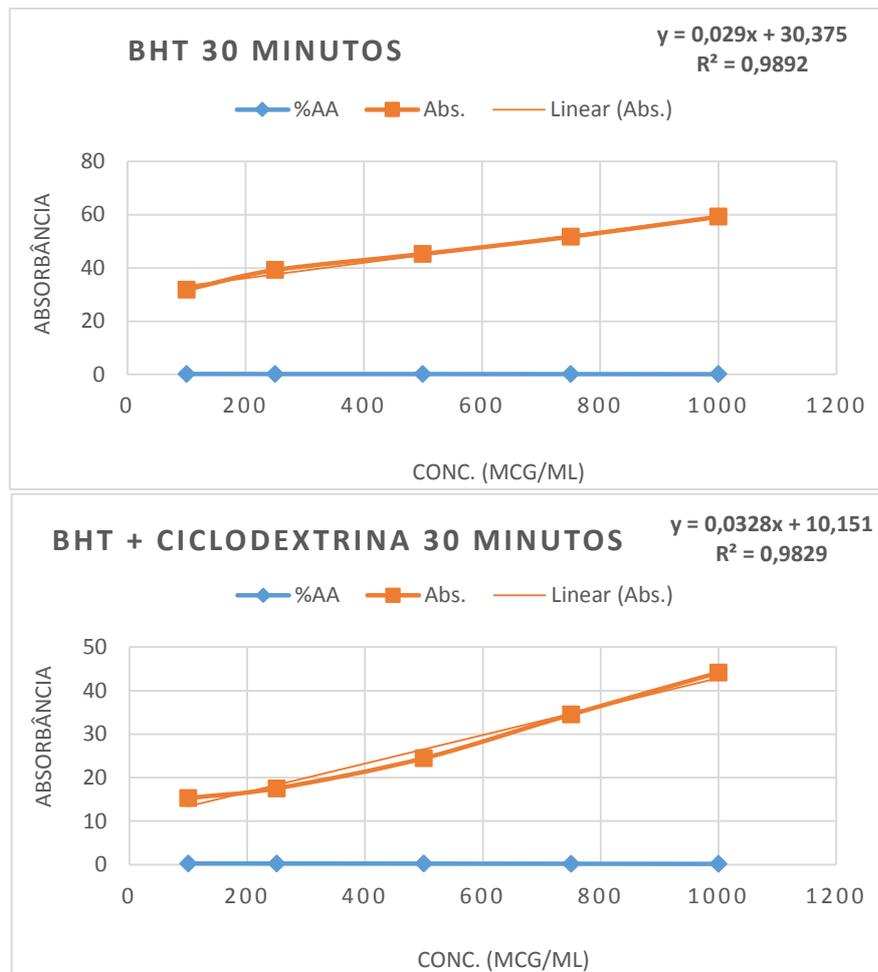


Figura 22. Valores do IC 50 das amostras após 30 minutos de leitura

Amostras	UVA	UVA + CICLODEXTRINA	SUCO	SUCO + CICLODEXTRINA	BHT	BHT + CICLODEXTRINA
30 MINUTOS	963,74	1791,60	1401,71	2164,91	676,72	1291,51

As ciclodextrinas naturais apresentam algumas limitações devido à sua baixa solubilidade aquosa e em solventes orgânicos (SALTÃO E VEIGA 2001). De acordo com os resultados obtidos é possível observar que a característica encapsulante do sistema carreador acaba por “proteger o ativo” e conseqüentemente diminuir o seu potencial antioxidante. A alta capacidade antioxidante dos flavonóides está provando que eles são altamente eficazes para várias doenças mediadas por radicais livres e, portanto, gradualmente emergindo como alternativas viáveis aos medicamentos convencionais.

Esses compostos contêm um ou mais grupos hidroxilas aromáticos, que seqüestram os radicais livres e são responsáveis pela alto potencial antioxidante (CHAUDHURI et al., 2013). O uso da técnica extrativa também pode ter contribuído para os resultados uma vez que, por não usar aquecimento no processo extrativo, pode ter havido uma maior conservação dos componentes químicos extraídos. Martins et. al. (2011) corrobora descrevendo que o produto permanece sem alterar sua composição química.

Em geral, a capacidade antioxidante das substâncias bioativos depende de três fatores: o potencial de quelar metais, porque está fortemente relacionada ao arranjo dos grupos hidroxilas e carbonilas ao redor da molécula, a presença de hidrogênio ou elétrons substituintes capazes de reduzir os radicais livres, e a capacidade do flavonoide, por exemplo, de deslocar o elétron não emparelhado, conduzindo à formação de um radical estável (MUSIALIK et al., 2009; SHAHIDI, AMBIGAIPALAN, 2015). Deste modo, dependendo da natureza química das moléculas antioxidantes, é importante o uso de diferentes métodos para fornecer uma estimativa mais precisa para as amostras analisadas (RIBEIRO, 2016). A atividade antioxidante da uva pode estar ligada a vários fatores (RIBEIRO, 2016).

Segundo Barreiros, David, David (2006) e Dorta et al. (2008), os compostos fenólicos, em particular, os flavonoides possuem estrutura ideal para o sequestro de radicais, além de serem potenciais agentes quimioprotetores ou suplementares contra diversos estados patológicos envolvendo dano oxidativo celular, sendo antioxidantes efetivos. A atividade antioxidante dos flavonoides ainda depende da sua estrutura e da habilidade do flavonoide em deslocalizar o elétron desemparelhado (RIBEIRO, 2016).

De acordo com Gan e Latiff (2011), a acetona promove um maior rendimento de fenólicos que o etanol, metanol, acetato de etila e hexano. O que não foi aplicável para as amostras analisadas neste trabalho, visto que a diluição ocorreu com metanol. Desta forma podemos sugerir que o solvente pode ter influência teor de fenólicos presentes nas amostras, conseqüentemente influenciando assim no potencial antioxidante das mesmas. Em trabalho realizado por Lafka et al. (2007), o extrato hidroalcoólico apresentou o maior teor de fenólicos, entretanto este não exibiu a maior atividade antioxidante. Extrações hidroalcoólicas são ainda mais eficientes que o próprio solvente puro, sendo o etanol o mais utilizado, por ser um solvente polar e responsável pela extração de flavonóides e seus glicosídeos, catecóis e taninos de matérias vegetais (LOMOLINO et al., 2010).

Mix, ou *blends* de uvas apresentaram-se como excelentes fontes de compostos fenólicos, o que está associado com inúmeros benefícios à saúde (BOAS, et al., 2016). Porém é possível observar uma redução do teor de fenólicos totais, conseqüentemente um menor potencial antioxidante quando comparadas a amostra do suco de uva integral industrializado (composto por um *blend* de duas variedades de uvas, Isabel e Bordô) com a uva in natura. Segundo Malacrida e Mota (2005), essa variabilidade é justificada por uma série de fatores, que podem interferir diretamente no conteúdo de fenólicos de sucos, como: a cultivar de uva utilizada, o grau de maturação, práticas agrícolas e procedimentos adotados durante a elaboração, conservantes presentes e o armazenamento dos sucos.

O aumento na temperatura durante métodos de extração e preparo do sistema carreador e até mesmo das amostras pode ter influenciado diretamente em uma diminuição da atividade antioxidante. Isto ocorre provavelmente devido ao fato de que a maioria destes compostos antioxidantes, como os polifenóis e antocianinas, são instáveis e altamente susceptíveis a degradação térmica (FERREIRA, et.al., 2016).

6.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada através de uma abordagem não paramétrica, pelo teste de Kruskal-Wallis (Programa Statistica - SPSS Versão 2015). Esse teste é um correspondente não paramétrico da análise de variância. O nível de significância adotado tanto no teste de efeitos quanto na ordenação dos valores centrais foi o padrão, $p > 0,05$ (CAMPOS, 1983). Todas análises estatísticas foram realizadas em triplicata, sendo os resultados expressos como média \pm desvio padrão (D.P.). As análises foram efetuadas sobre os resultados da avaliação da atividade antioxidante com a adição e sem o sistema de complexação. Somente as amostras de uva in natura sem a ciclodextrina se mostraram estatisticamente significativas quando comparadas com as amostras de suco de uva integral industrializado.

Porém, de acordo com as análises realizadas, as quatro amostras analisadas quando comparadas com entre si, não apresentaram significância entre elas, sendo o valor de $p > 0,05$. Foi possível exibir através da análise estatística significâncias assintóticas, o que indica uma maior necessidade de se obter amostras com um N maior.

7. Conclusão

Os resultados da análise de estabilidade física vêm comprovar que as amostras armazenadas em temperaturas elevadas como 35°C ou mesmo temperatura ambiente podem perder sua estabilidade e possivelmente diminuir ou perder sua atividade biológica, não sendo viável este tipo de armazenamento. O armazenamento dessas preparações deve ser realizado sob refrigeração, para ganho na estabilidade da amostra. A partir do resultado da análise de estabilidade observou-se que a variação de temperatura influencia diretamente na variação do pH e das características organolépticas. Isto pode resultar em diferentes teores de compostos bioativos e em uma variação da sua atividade antioxidante.

Foi possível formar amostras em pó, a partir de extrato fenólico aquoso de uva in natura (*vitís vinífera*) e Suco de Uva Integral (mix de uva Bordô e Isabel), utilizando goma arábica através do método de atomização. Os pós elaborados tiveram alta higroscopicidade, baixa temperatura de transição vítrea e presença de partículas aglomeradas, e presença contéudos de compostos bioativos. A elaboração de micropartículas liofilizadas e atomizadas utilizando goma arábica, resultou em pós com retenção dos contéudos de fenóis totais e antocianinas monoméricas totais abaixo do esperado. Quando realizada a triagem de métodos de avaliação das substâncias bioativas, seus resultados não foram tão significantes quando comparados com o método de obtenção do extrato através do Rotaevaporador.

Os teores de compostos bioativos são significativamente diferentes quando realizados diferentes métodos de extração das amostras de Uva in natura e Suco Integral Industrializado. A otimização dos métodos de extração objetivou analisar qual método apresentaria um maior teor de compostos bioativos, tal otimização foi direcionada para minimizar custos e analisar qual método pode ser mais rentável. Após os resultados observou-se que o método que apresentou resultados mais satisfatórios foi obtido através do Rotaevaporador.

Após desenvolvido o sistema carreador e analisado seu potencial antioxidante através do método do DPPH, observou-se que o encapsulamento do ativo não promove uma maior atividade, seja por proteção ou por incompatibilidade do ativo com a ciclodextrina. Ainda foi possível observar através do resultado da atividade

antioxidante que a uva in natura apresentou uma maior atividade antioxidante, quando comparada com o suco de uva integral industrializado. Tal resultado pode ser justificado pelo teor de componentes no suco, o que promoveriam uma diferença de leitura ou tão somente pela diferença da variedade da uva, sendo o suco um “mix” das variedades Bordo e Isabel e a Uva in natura ser da variedade Vitória. Outra justificativa da diferença do resultado da atividade antioxidante seria a diferença de plantio e solo. Mais testes são necessários para descrever a estabilidade do sistema carreador quando associados à ativos com baixo teor de pH.

8. Referências

Allen K., Blascovich J., Mendes W. B. **Cardiovascular reactivity and the presence of pets, friends, and spouses: the truth about cats and dogs.** Psychosom. Med. 64, 727–739.10.1097/01.PSY.0000024236.11538.41. (1983).

ALOTHMAN, M.; BHAT, R.; KARIM, A. A. **UV Radiation-Induced Changes of Antioxidant Capacity of Fresh-Cut Tropical Fruits.** Innov. Food Sci. and Emerg. Tech., v. 10, p. 512-516, 2009.

AMENDOLA, D.; FAVERI, D.M. DE; SPIGNO, G. **Grape marc phenolics: Extraction kinetics, quality and stability of extracts.** Journal of Food Engineering, v.97, p.384-392, 2010.

ANCOS, B.; GONZÁLEZ, E.M.; CANO, M.P. **Ellagic acid, vitamin C, and total phenolic contents and radical scavenging capacity affected by freezing and frozen storage in raspberry fruit.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.48, p.4565-4570, 2000.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. **Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão.** Revista do Instituto Adolfo Lutz, v. 66, p. 232-240, 2007

ANISSIMOV, Y. G.; JEPPE, O. G.; DANCİK, Y.; ROBERTS, M. S. **Mathematical and pharmacokinetic modelling of epidermal and dermal transport processes.** Advanced Drug Delivery Reviews 2013, 65, 169.

ARARUNA, S. M.; SILVA, A. H.; CANUTO, K. M.; SILVEIRA, E. R.; LEAL, L. K. A. M. **Influence of process conditions on the physicochemical characteristics of cumaru (*Amburana cearensis*) powder produced by spray drying.** Brazilian Journal of Pharmacognosy, Curitiba, PR, v. 23, n. 1, p. 132-137, jan./feb. 2013.

ANTUNES, A. F. V. **Sistemas nanoparticulados aplicados à dermocosmética.** 2016.

ATKINS P, JONES L. **Princípios de Química: questionando a vida moderna e o meio ambiente**. Alencastro RB, tradutor. 3a ed. Porto Alegre: Bookman; 2006.

AZULAY, D. R.; **Dermatologia**. 5a. ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2011.

BACHTOLD, G. **Introdução aos Antioxidantes**. Bioquímica e Biofísica.

Universidade de Brasília. 2013. Disponível

em: <https://radicaislivres97.wordpress.com/2013/05/26/introducao-aos-antioxidantes/>

BAKOWSKA-BARCZAK, A.M.; KOLODZIEJCZYK, P.P. **Black currant polyphenols: their storage stability and microencapsulation**. *Industrial Crops and Products*, v.34, p.1301-1309, 2011.

BAKOWSKA, A.; KUCHARSKA, A.Z.; OSZMIANSKI, J. **The effects of heating, UV irradiation, and storage stability of the anthocyanin-polyphenol copigment complex**. *Food Chemistry*, v.81, p.349-355, 2003.

BARBOSA, K. B. F., *et al.*, **Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios**. *Rev. Nutr.*, Campinas, 23(4):629- 643, jul./ago., 2010.

BARCIA, M. T. et al. **Phenolic composition of grape and winemaking by-products of Brazilian hybrid cultivars BRS Violeta and BRS Lorena**. *Food Chemistry*, v. 159, p. 95-105, 2014.

BECHELLI, L; BOMBARDA,P.C.P; DE ABREU, F.F. **Uma nova proposta para avaliação de cosmeceútico antioxidante no tratamento da pele afetada pelos efeitos da vida urbana**. *Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal*. 2016. *Surg Cosmet Dermatol* 2016;8(1):46-54.

BELITZ, H. D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. **Fruits and fruit products**. In: *Food Chemistry*, Berlin Heidelberg: Springer, p. 807-861, 2009.

BEAR, M.F; CONNORS, B,W.; PARADISO, M.A. **Neurociências – desvendando o sistema nervoso**. porto alegre. 2ª ed. artmed editora, 2002

BIANCHI; M. de L. P.; ANTUNES, L. M. G. **Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta**. Rev. Nutr, v. 10, n.02, p. 99-105, 2011.

BONE, K., & MILLS, S. **Principles and practice of phytotherapy: Modern herbal medicine**. UK: Elsevier Health Sciences. 2013

BOTREL, D. A.; BORGES, S. V.; FERNANDES, R. V. B.; CARMO, E. L. **Optimization of fish oil spray drying using a protein: inulin system**. Drying Technology, Abingdon, UK, v. 32, n. 3, p. 279-290, Jan. 2014.

BOUTERFAS R, BELKOURA M, DAUTA A. **The effects of irradiance and photoperiod on the growth rates of three freshwater green algae isolated from a eutrophic lake**. (2006) Limnetica 25:647–656

BRASIL. **Farmacopeia brasileira: agência nacional de vigilância sanitária**. Brasília: ANVISA, 2010. v. 2.

BRAVO, L. **Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance**. Nutrition Reviews, v.56(11), p.317-333, 1998.

BORBA, P.A.A.; RIEKES, M.K; PEREIRA, R.N. ; STULZER, H.K.**Desenvolvimento e validação de um método analítico por espectrofotometria uv para quantificação de carvedilol** - Quim. Nova, Vol. 36, No. 4, 582-586, 2013

CHAICOUSKI, A.; SILVA, J. E.; TRINDADE, J. L. F.; CANTERI, M. H. G. **Determinação da quantidade de compostos fenólicos totais presentes em extratos líquido e seco de erva-mate (*Ilex paraguariensis*)**. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, v.16, n.1, p.33-41, 2014.

CHAGAS, J. O.; CORRÊA, S.; ALMEIDA, A. M. de. **Uso de sistema ternário homogêneo de solventes e espectrofotometria UV-VIS no desenvolvimento de método para a determinação de cobre em amostras de açúcar.** UNIFOR-MG, Formiga, v. 9, n. 1, p. 59-73, jan./jun. 2014

CHENG, V. J.; BEKHIT, A. E. A.; McCONNELL, M.; MROS, S.; ZHAO, J. **Effect of extraction solvent, waste fraction and grape variety on the antimicrobial and antioxidant activities of extracts from wine residue from cool climate.** Food Chemistry, v. 134, p. 474-482, 2012.

CALISKAN, G.; DIRIM, S. N. **The effects of the different drying conditions and the amounts of maltodextrin addition during spray drying of sumac extract.** Food and Bioproducts Processing, Rugby, v. 91, n. 4, p. 539-548, oct. 2013

CAMPOS, J.S.; FRASSON, A.P.Z. **Avaliação da atividade antioxidante do extrato aquoso de Lafoensia pacari A. ST-HIL. em emulsão não-iônica.** Revista Ciências Farmácia Básica Apl., 2011;32(3):363-368 ISSN 1808-4532.

CAMPOS, H. de. **Estatística experimental não paramétrica.** 4. ed. Piracicaba: ESALQ, 1983.

CARVALHO, J.C.S. **Desenvolvimento de chocolates ao leite com propriedades funcionais acrescidos de folhas de Brassica oleracea (couve) e frutos de vitis vinífera(uva).** São Paulo 2016

CASTILHOS, M.B.M; DEL BIANCHI, V.L. **Vinhos tintos do noroeste paulista: relação entre os perfis físico-químico e sensorial.** HoloS, v.4, p. 80-89, 2012.

CHAOVANALIKIT, A.; WROLSTAD, R.E. **Total anthocyanins and total phenolics of fresh and processed cherries and their antioxidant properties.** Journal of Food Science, v.69, p.FCT67-FCT72, 2004.

CHEDEA, V. S.; BRAICU, C.; SOCACIU, C. **Antioxidant - prooxidant activity of a polyphenolic grape seed extract.** Food Chemistry, v. 121, p. 132–139, 2010.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2005.

CLIFFORD, M.N. **Anthocyanins: Nature, occurrence and dietary burden**. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.80, p.1063–1072, 2000.

COQUEIRO, A.Y. et al., **Creatina como antioxidante em estados metabólicos envolvendo estresse oxidativo**. *Revista Brasileira de Prescrição e Fisiologia do Exercício, São Paulo*. v.11. n.64. p.128-137. Jan./Fev. 2017. ISSN 1981-9900.

CORREIA, A. dos R. C.; F. M. C.. **Estudo Cienciométrico de Nanocosméticos**. III Congresso de Ensino Pesquisa e Extensão. Universidade Estadual de Goiás. Outubro 2016.

COUTO, R. O.; et al., **Spray dried Rosemary extracts: physicochemical and antioxidant properties**. *Food Chemistry, London*, v. 131, n. 1, p. 99-105, mar. 2012.

CROZIER, A.; CLIFFORD, M.N.; ASHIHARA, H. **Plant secondary metabolites. Ocurrence, structure and role in the human diet**. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd., 2006. 384p.

CRUZ, J.M.; CONDE, E.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J.C. **Thermal stability of antioxidants obtained from wood and industrial wastes**. *Food Chemistry*, v.100, p.1059-1064, 2007

CUNHA, A.G. da. **Dicionário etimológico da língua portuguesa**. 4. ed. rev. e atual. Rio de Janeiro: Lexikon, 2012.

DE PAULA, I, E; CARVALHO, J,C; LIMA,V, T; PESSOA, C, V. **Nutricosméticos a base de extrato de semente de uva (vitis vinífera) para o fotoenvelhecimento cutâneo**. Mostra Científica da Farmácia. 2016, Quixadá. Anais.Quixadá: Centro Universitário Católica de Quixadá, 2016.

DEWANTO V, WU X, ADOM KK, LIU RH. **Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity.** J Agric Food Chem. 2002;50(10):3010-4.

DRÉNO, B. **Anatomie, immunologie de la peau et de ses annexes.** Annales de Dermatologie et de Vénérologie 2008, 135, 149.

DUANGMAL, K.; APENTEN, R.K.O. **A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano).** Food Chemistry, v.64, p.351-359, 1999

FANG, Z.; BHANDARI, B. **Effect of spray drying and storage on the stability of bayberry polyphenols.** Food Chemistry, v.129, p.1139-1147, 2011.

FAOSTAT-FAO (2014). **Statistical Database. Food and Agriculture Organization of the United Nations.** Disponível em: <www.fao.org> Acesso em: 15/02/2016.

FARHADI, K. et al. **Determination of phenolic compounds content and antioxidant activity in skin, pulp, seed, cane and leaf of five native grape cultivars in West Azerbaijan province, Iran.** Food Chemistry, v. 199, p. 847-855, 2016.

FERREIRA, J. I. P. R. **Desenvolvimento nanotecnológico de dispositivos biomédicos e dermocosméticos.** 2012. Tese de Doutorado.

FERREIRA, V.B. **E-science e políticas públicas para ciência, tecnologia e inovação no Brasil: colaboração, infraestrutura e repercussão nos institutos nacionais de ciência e tecnologia da área de nanotecnologia.** universidade federal da bahia - instituto de ciência da informação programa de pós-graduação em ciência da informação- tese de doutorado. Salvador 2016.

FERRERA, T.S.; HELDWEIN, A.B.; DOS SANTOS, C.O.; SOMAVILLA, J.C.; SAUTTER, C.K. **Substâncias fenólicas, flavonoides e capacidade antioxidante em erva-mate sob diferentes coberturas do solo e sombreamentos.** Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

FORMAN HJ, AUGUSTO O, FLOHE-BRIGELIUS R. **Even free radicals should follow some rules: A Guide to free radical research terminology and methodology.** Free Radical Biology and Medicine. 2015 Jan; 78:233-235.

FRAGA, C.G. **Plant phenolics and human health: biochemistry, nutrition and pharmacology.** New Jersey: Wiley & Sons, 2009. 593p.

FRANZEN, J. M.; SANTOS, J. M. S. R.; ZANCANARO, V. **Colágeno: Uma Abordagem para a Estética. Caçador.** Porto, 2013.

FU, P. Q.; KAWAMURA, K.; KANAYA, Y.; WANG, Z. F.: **Contributions of biogenic volatile organic compounds to the formation of secondary organic aerosols over Mt. Tai, Central East China, Atmos. Environ., v. 44, p. 4817–4826, 2010.**

GAN, C.; LATIFF, A. A. **Optimisation of the solvent extraction of bioactive compounds from *Parkia speciosa* pod using response surface methodology.** Food Chemistry, v. 124, p. 1277–1283, 2011.

GAWEL, R. **Red wine astringency: a review.** Australian Journal of Grape and Wine Research, v.4, p.74-95, 1998.

GHARSALLAOUI, A.; ROUDOUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R. **Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview.** Food Research International, Barking, v. 40, n 9, p. 1107-1121, nov. 2007

GHASEMZADEH A, JAAFAR HZE, KARIMI E. **Involvement of Salicylic Acid on Antioxidant and Anticancer Properties, Anthocyanin Production and Chalcone Synthase Activity in Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) Varieties.** *International Journal of Molecular Sciences.* 2012;13(11):14828-14844. doi:10.3390/ijms131114828.

GOUVÊA, A.C.M.S; DE ARAUJO, M.C.P; SCHULZ, D.F; Sidney PACHECO , GODOY, R.L.DE O; CABRAL, L.M.C. **Endogenous electromagnetic forces**

emissions during cell respiration as additional factor in cancer origin. *Embi Cancer Cell Int* (2016) 16:60 DOI 10.1186/s12935-016-0337.

GUEDES F. DE L. et al. Cyclodextrins: as a technological adjuvant to improve drugs. *Bioavailability - Rev. Bras. Farm*, 2008

GUERRERO, R.F.; LIAZID, A.; PALMA, M.; PUERTAS, B.; GONZÁLEZ-BARRIO, R.; GIL-IZQUIERDO, A.; GARCÍA-BARROSO, C.; CANTOS-VILLAR, E. **Phenolic characterisation of red grapes autochthonous to Andalusia.** *Food Chemistry*, v.4, p.74-95, 2009.

GUERRERO, R.F.; PUERTAS, B.; FERNÁNDEZ, M.L.; PALMA, M.; CANTOS-VILLAR, E. **Induction of stilbenes in grapes by UV-C: Comparison of different subspecies of Vitis.** *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v.11, p.231-238, 2010.

HAMINIUK, C. W. I. et al. **Chemical, antioxidant and antibacterial study of Brazilian fruits.** *International Journal of Food Science and Technology*, v. 46, p. 1529-1537, 2011.

HAMINIUK, C. W. I. et al. **Phenolic compounds in fruits – an overview.** *International Journal of Food Science and Technology*, v. 47, p. 2023-2024, 2012.

HIJO, A. A. C. T., COSTA, J. M. G., SILVA, E. K., AZEVEDO, V. M., YOSHIDA, M. I., BORGES, S. V. **Physical and termal properties of oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil microparticles.** *Journal of Food Process Engineering*, Westport, v. 38, n. 1, p. 1-10, feb. 2015.

HOPPE J.E. **Treatment of oropharyngeal candidiasis in immunocompetent infants: a randomized multicenter study of miconazole gel vs. nystatin suspension.** *The Antifungals Study Group. Pediatr Infect Dis J.* 1997;16(3):288-93.

HOPKINS, W.G.; HÜNER, N.P. A. **Introduction to plant physiology.** 4th ed. Nova Jersey: John Wiley & Sons Inc. 503p.2008.

HUFNAGEL, J.C.; HOFMANN, T. **Orosensory-Directed Identification of Astringent Mouthfeel and Bitter-Tasting Compounds in Red Wine.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.56, p.1376-1386, 2008.

JARA-PALACIOS, M. J. et al. **Assessment of white grape pomace from winemaking as source of bioactive compounds, and its antiproliferative activity.** Food Chemistry, v. 183, p. 78-82, 2015.

ISAAC, V.L.B.; CEFALI, L.C.; CHIARI, B.G.; OLIVEIRA, C.C.L.G.; SALGADO, H.R.N.; CORREA, M.A. **Protocolo para ensaios físico- químicos de estabilidade de fitocosméticos.** Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences, v.29, n.1, p. 81-96, 2008.

JIMÉNEZ, N.; BOHUON, P.; DORNIER, M.; BONAZZI, C.; PÉREZ, A.M.; VAILLANT, F. **Effect of water activity on anthocyanin degradation and browning kinetics at high temperatures (100-140°C).** Food Research International, v.47, p.106-115, 2012.

JUNIOR, A. et al. **Cromatografia de troca-iônica aplicada ao isolamento da fração ácida do óleo de cabaíba e da sacaca.** 2005.

KEDE, Maria; SABATOVICH, Oleg. **Dermatologia Estética.** São Paulo: Atheneu, 2009.

LAFKA, T.; SINANOGLU, V.; LAZOS, E. S. **On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes.** Food Chemistry, v. 104, p. 1206-1214, 2007.

LARRAURI, J.A.; RUPÉREZ, P.; SAURA-CALIXTO, F. **Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.45, p.1390-1393, 1997.

LEITE, M.F. et al. **Prospecção tecnológica sobre o uso da nanotecnologia em formulações fotoprotetoras.** Cadernos de Prospecção, v. 8, n. 4, p. 725, 2015.

LOFTSSON T, BREWSTER ME. **Pharmaceutical applications of cyclodextrin I. Drug solubilization and stabilization.** J Pharm Sci. 1996;85(10):1017- 25.

LOMOLINO, G.; ZOCCA, F.; SPETTOLI, P.; ZANIN, G.; LANTE, A. **A preliminary study on changes in phenolic content during Bianchetta Trevigiana winemaking.** Journal of Food Composition and Analysis, v. 23, p. 575–579, 2010.

LÓPEZ-MIRANDA, S. et al. **Use of cyclodextrins to recover catechin and epicatechin from red grape pomace.** Food Chemistry, v. 203, p. 379-385, 2016.

MALACRIDA, C. R.; MOTTA, S. **Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 25, p. 659-664, 2005.

MANFROI, L. et al. **Composição Físico-Química do vinho Cabernet Franc provenientes de videiras conduzidas no sistema lira aberta.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 26, n. 2, p. 290- 296, 2006.

MANOEL, T. C. **Estudo das interações de complexos de inclusão flavonoide/ciclodextrina com modelos de membrana biológica por simulações de dinâmica molecular.** São José do Rio Preto 2016

MARZZOCO A; TORRES B,B. **Bioquímica Básica.** 4a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2015. Capítulo 11, Cadeia de Transporte de Elétrons e Fosforilação Oxidativa, p. 144 -146.

MASTERS, K. **Spray Drying Handbook.** 3. ed. New York: John Wiley & Sons Inc. 1979.

MATHEW, A.G.; PARPIA, H.A.B. **Food browning as a polyphenol reaction.** Advances in Food Research, v.29, p.75-145, 1971.

MEDOUNI-ADRAR, S. et al. **Optimization of the recovery of phenolic compounds from Algerian grape by-products.** *Industrial Crops and Products*, v. 77, p. 123-132, 2015.

MELO, A. A. M.; BOAS, E. V. de B. **Inibição do escurecimento enzimático de banana maçã minimamente processada.** *Ciênc Tec Alim*, v. 23, n. 01, p. 28-32, 2010.

MISHRA, P.; MISHRA, S.; MAHANTA, C. L. **Effect of maltodextrin concentration and inlet temperature during spray drying on physicochemical and antioxidant properties of amla (*Emblica officinalis*) juice powder.** *Food and Bioproducts Processing*, Rugby, v. 92, n. 3, p. 252-258, jul. 2014.

MONAGAS, M.; BARTOLOME, B.A.; GOMEZ-CARDOVE, C. **Updated knowledge about the presence of phenolic compounds in wine.** *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.45, p.85-118, 2005.

MOUAD, A. M.; PORTO, A. L. M. **Uma Abordagem Química sobre a Pele e a Biocatálise no Desenvolvimento de Moléculas Antioxidantes de Aplicação Cosmética.** *Rev. Virtual Quim.* 2014, 6 (6), 1642-1660.

MUÑOZ-ESPADA, A. C. et al. **Anthocyanin quantification and radical scavenging capacity of Concord, Norton, and Marechal Foch Grapes and wines.** *J. Agric. Food Chem.*, v. 52, p. 6779-6786, 2004.

MURCIA MA, EGEA I, ROMOJARO F, PARRAS P, JIMENEZ AM, MARTINEZ-TOME M **Antioxidant evaluation in dessert Spices compared with common food additives: Influence of irradiation procedure.** 2004. *J Agric Food Chem* 52: 1872-1881.

NAVARRO, D. **Estudo Químico, Biológico e Farmacológico das espécies *Allamanda blanchetti* e *Allamanda schottii* na obtenção de moléculas bioativas de potencial terapêutico.** Florianópolis:2005

NESTERENKO, A.; ALRIC, I.; SILVESTRE, F.; DURRIEU, V. **Vegetable proteins in microencapsulation: A review of recent interventions and their effectiveness.** *Industrial Crops and Products*, Amsterdam, v. 42, p. 469– 479, mar. 2013

NICHOLSON, R.L.; HAMMERSCHMIDT, R. **Phenolic compounds and their role in disease resistance**. Annual Review of Phytopathology, v.30, p.369-380, 1992.

NUNES, L. I.; MERCADANTE, A. Z.; **Antioxidantes alimentares importância química e biológica**. Ver Soc Bras Alim nutri, v. 34, n. 03, P.231-247, 2011.

OBREQUE-SLIER, E.; PEÑA-NEIRA, A.; LÓPEZ-SOLÍS, R.; ZAMORA-MARÍN, F.; RICARDO-DA SILVA, J. M.; LAUREANO, O. **Comparative Study of the Phenolic Composition of Seeds and Skins from Carménere and Cabernet Sauvignon Grape Varieties (*Vitis vinifera* L.) during Ripening**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.58, p.3591-3599, 2010.

OKANO, L. T.; BARROS, T. C.; CHOU, D. T. H.; BENNET, A. J.; BOHNE, C. **Complexation dynamics of xanthone and thioxanthone to β -cyclodextrin derivatives** *J. Phys. Chem. B* 2001, 105, 2122.

OLIVEIRA, D.M.; BASTOS, D.H.M. **Biodisponibilidade de ácidos fenólicos**. Química Nova, v.34(6), 2011.

OLIVEIRA, L.C.; SOUZA, S.O.; MAMEDE, M.E.O. **Avaliação das características físico-químicas e colorimétricas de vinhos finos de duas principais regiões vitícolas do Brasil**. Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, v. 70, n.2, p. 158-167, 2011.

PAULA, C. DA S. et al., **Potencial antioxidante in vitro das folhas da *Bauhinia unguolata* L.** Rev Ciênc Farm Básica Apl., 2014;35(2):217-222 ISSN 1808-4532

PIES, G. **Tecnologia supercrítica aplicada à obtenção de extratos ricos em compostos fenólicos a partir de casca de jabuticaba *plinia trunciflora* (o. Berg) kausel**. Dissertação de mestrado. Florianópolis, 2017.

PIETTA, P.G. **Flavonoids as antioxidants**. Journal of Natural Products, v.63, p.1035-1042, 2000.

PRIDHAM, J.B. **Phenolics in Plants in Health and Disease**. New York: Pergamon Press, 1960.

RESENDE, R. **Nanotecnologia à base de micro-organismos- Fungo que produz nanomateriais**. Edição vol. 3, n. 10, 2016

REYES, L.F.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. **Degradation kinetics and colour of anthocyanins in aqueous extracts of purple- and red-flesh potatoes (*Solanum tuberosum* L.)**. Food Chemistry, v.100, p.885-894, 2007.

REZENDE, L.C. **Avaliação da atividade antioxidante e composição química de seis frutas tropicais consumidas na Bahia**. Tese de Doutorado. 2010.

RIBEIRO, C. **Cosmetologia aplicada a dermoestética**. São Paulo: Pharmabooks. 2006.

RIBEIRO, L.F. **Avaliação dos compostos bioativos e atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* em bagaços de uvas (*Vitis vinífera* e *Vitis labrusca*)** CURITIBA - 2016

RIZZON, L. A., MIELE, A.; MENEGUZZO, J. **Avaliação da uva Isabel para a elaboração de vinho tinto**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 20, p. 115-121, 2000.

ROCKENBACH, I. I. et al. **Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red grapes (*Vitis vinifera* L. and *Vitis Labrusca* L. widely produced in Brazil**. Food Chemistry, v. 127, p. 174-179, 2011.

ROCKENBACH, I.I.; RODRIGUES, E.; V.M.; GONZAGA, L.V.; GENOVESE, M.I.; GONÇALVES, A.E.S.S.; FETT, R. **Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red grapes (*Vitis vinifera* L. and *Vitis labrusca* L.) widely produced in Brazil**. Food Chemistry, v.127, p.174-179, 2011.

RODRIGUES et al. **Métodos para determinar taninos em sorgo, avaliando-se o desempenho de aves e a digestibilidade *in vitro* da matéria seca.** Ciênc. e Agrotec., Lavras, v.22, n.4, p.540-550, out./dez., 1998

ROSA, J. S. et al. **Desenvolvimento de um método de análise de vitamina C em alimentos por cromatografia líquida de alta eficiência e exclusão iônica.** Ciê Tec. Alim, v. 24, n.01, p.87-93, 2012.

RUIVO, A. P. **Envelhecimento Cutâneo: Fatores Influentes, Ingredientes Ativos e Estratégias de Veiculação.** Porto, 2014.

RUBIO, F.T.V. **Biossorção de compostos fenólicos de bagaços de uva em *saccharomyces cerevisiae*: mecanismos do processo e bioacessibilidade.** universidade tecnológica federal do paraná programa de pós-graduação em tecnologia de alimentos. dissertação. campo mourão 2017.

SAENGER, W. **Cyclodextrin inclusion compounds in research and laboratory.** Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1980. 344-362.

SAHOO, S. K.; DILNAWAZ, F.; KRISHNAKUMAR, K.; **Nanotechnology in ocular drug delivery.** Drug Discovery Today 2008, 13, 144

SALDANHA, L. A. **Avaliação da atividade antioxidante “in vitro” de extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) verde e tostada e chá verde (*Camellia sinensis*).** Dissertação (Mestre em Saúde Pública), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

SALTÃO, R; VEIGA, F. **Ciclodextrinas em novos sistemas terapêuticos.** Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences vol. 37, n. 1, jan./abr., 2001

SANTO A, ZHU H, LI YR. **Free Radicals: From Health to Disease. Reactive Oxygen Species.** 2016; 2(4):245-263.

SANTOS J., J. L. dos. **Ciência do futuro: a comunidade de pesquisa e o ciclo da política de nanociência no brasil.** 2011. 176 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2011.

SANTOS, H. S. et al. **A terapia nutricional com vitaminas antioxidantes e o tratamento quimioterápico oncológico.** Rev Bras de Canc, v. 19, n.01, p.23-28, 2010.

SCHALKA, S et al. **A new proposal for the evaluation of an antioxidant cosmeceutical in the treatment of the skin affected by the effects of urban life.** Surg Cosmet Dermatol 2016;8(1):46-54

SERRANO-CRUZ, M.R.; VILLANUEVA-CARVAJAL, A.; ROSALES, E.J.M.; DÁVILA, J.F.R.; DOMINGUEZ-LOPEZ, A. **Controlled release and antioxidant activity of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract encapsulated in mixtures of carboxymethyl cellulose, whey protein and pectin.** LWT – Food Science and Technology, v.50, p.554-561, 2013.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Phenolics in food and nutraceuticals.** Flórida, EUA: CRC Press, Boca Raton, 2004. 576p.

SCHEFFER , F.R. **Nanoestruturas de TiO₂: síntese, caracterização e aplicação.** Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2011.

SILVA, L. R.; QUEIROZ, M. **Bioactive compounds of red grapes from Dão region (Portugal): Evaluation of phenolic and organic profile.** Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, v. 6, p. 315-321, 2016.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK. P.R.(Orgs). **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 6.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS: Florianópolis: Editora da UFSC, 2010. 1104p.

SIMÕES, C. M.O; SCHENKEL, E.P; DE MELLO, L ; PALAZZO, J,C. **Farmacognosia: Do Produto Natural ao Medicamento.** Artmed Editora, 1 de nov de 2016 *apud* Sim

SK. Medicinal plant alkaloids: an introduction for pharmacy students. 2nd ed. Toronto: University of Toronto; 1965.

SIMON, M. **La dermatite atopique, est-elle toujours associée à une altération de la barrière épidermique?** Revue Française d'Allergologie 2013, 53, 125.

SIMÓN, B.F.; HERNÁNDEZ, T.; ESTRELLA, I. **Phenolic composition of white grapes (Var. Airen). Changes during ripening.** Food Chemistry, v.47, p.47-53, 1993.

SINGH, B. et al. **Bioactive compounds in banana and their associated health benefits – A review.** Food Chemistry, v. 206, p. 1-11, 2016.

SINGH, S.; DIXIT, D. **A review on spray drying: emerging technology in food industry.** International Journal of Applied Engineering and Technology, Jaipur, v. 4, n. 1, p. 1-8, jan./mar. 2014.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, S. **A Colorimetric of total phenolics with phosphomolibic-phosphotungstic acid reagents.** American Journal of Enology & Viticulture, California, US, v. 16, p. 144-158, 1965.

SÓLYOM, K.; SOLÁ, R.; COCERO, M.J.; MATO, R.B. **Thermal degradation of grape marc polyphenols.** Food Chemistry, v.159, p.361-366, 2014

SOUZA, J. S. N. de. **Estudo das interações do praziquantel com ciclodextrinas em sistemas multicomponentes.** 2016. Dissertação de Mestrado. Brasil.

SOUZA, V.B. **Aproveitamento dos subprodutos de vinificação da uva Bordô (*Vitis labrusca*) para obtenção de pigmentos com propriedades funcionais.** Tese. Pirassununga, 2013.

SZEJTLI, J. **Cyclodextrins in drug formulations: Part I.** Pharm. Tech. Int. 1991.15-22.

TAIZ, L.; ZEIGER, F. **Fisiologia Vegetal.** 3ªed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.

TOMMASINI, S.; RANERI, D.; FICARRA, R.; CALABRO, M. L.; STANCANELLI, R.; FICARRA. **Improvement in solubility and dissolution rate of flavonoids by complexation with beta-cyclodextrin.** *P.J. Pharm. Biomed. Analysis* 2004, 35, 379.

TONON, R.V.; BRABET, C.; HUBINGER, M.D. **Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray-dried açai (*Euterpe oleracea* Mart.) juice produced with different carrier agents.** *Food Research International*, v.43, p.907-914, 2010.

TORTORA, G. J.; GRABOWSKI, S. R. **Corpo humano- fundamentos de anatomia e fisiologia.** 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006

TOURNOUR, H. H. et al. **Valorization of grape pomace: Extraction of bioactive phenolics with antioxidant properties.** *Industrial Crops and Products*, v. 74, p. 397-406, 2015.

TÜRKBEN, C.; SARIBURUN, E.; DEMIR, C.; UYLASER, V. **Effect of freezing and frozen storage on phenolic compounds of raspberry and blackberry cultivars.** *Food Analytical Methods*, v.3, p.144-153, 2010.

UEKAMA K. **Design and evaluation of cyclodextrin-based drug formulation.** *Chem Pharm Bull.* 2004;52(8):900-15.

WINK, M. **Annual Plant Reviews, Volume 40: Biochemistry of Plant Secondary Metabolism.** 2 nd ed. Wiley-Blackwell, 2010. 445p.

YORUK, R.; MARSHALL, M.R. **Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review.** *Journal of Food Biochemistry*, v.27, p.361-422, 2003.

ZAGKLIS, D. P.; PARASKEVA, C. A. **Purification of grape marc phenolic compounds through solvent extraction, membrane filtration and resin adsorption/desorption.** *Separation and Purification Technology*, v. 156, p. 328-335, 2015.

ZHOU, Jiawen; RITTER, Helmut. **Cyclodextrin functionalized polymers as drug delivery systems**. Polymer Chemistry, v. 1, n. 10, p. 1552-1559, 2010.

ZORZI, G. K. et al., **Biomateriais para formulações de base nanotecnológica visando terapia genética ocular**. Quim. Nova, Vol. 40, No. 1, 74-84, 2017