



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

ÉRCIA XAVIER NOVAIS DE SOUZA

Desenvolvimento e avaliação de sistemas lipossomais com
bioativos de uva (*Vitis vinifera*) para medicamentos e
cosméticos

Salvador
2015

ÉRCIA XAVIER NOVAIS DE SOUZA

Desenvolvimento e avaliação de lipossomas com bioativos de uva (*Vitis vinifera*) para medicamentos e cosméticos

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

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

Co orientador: Dr. Ademir Evangelista do Vale

Salvador
2015

Souza, Ércia Xavier Novais de
Desenvolvimento e avaliação de lipossomas com bioativos de uva
(*Vitis vinífera*) para medicamentos e cosméticos / Ércia Xavier Novais de
Souza. - - Salvador, 2015.
88 f.

Orientadora: Lidércia C. R. C. e Silva.
Coorientador: Ademir Evangelista do Vale.
Dissertação (Mestrado -Programa de Pos Graduação em
Biotecnologia) - - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da
Saúde, 2015.

1. Uva. 2. Resíduo industrial. 3. Compostos fenólicos. 4.
Atividade antioxidante. 5. PCA. I. Silva, Lidércia C.R.C. II. Vale, Ademir
Evangelista. III. Universidade Federal da Bahia. IV. Desenvolvimento e
avaliação de lipossomas com bioativos de uva (*Vitis vinífera*) para
medicamentos e cosméticos

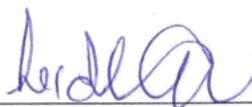
ÉRCIA NOVAIS DE SOUZA

**Desenvolvimento e avaliação de sistemas lipossomais com
bioativos de uva (*Vitis vinifera*) para Medicamentos e
Cosméticos**

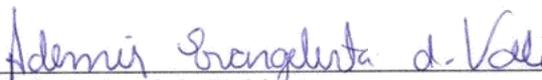
Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia pelo Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

Aprovada em 27 de novembro de 2015.

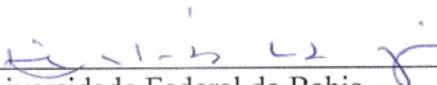
Lidércia Cavalcanti Ribeiro Cerqueira e Silva – Orientadora
Doutora em Química pela Universidade Federal da Bahia,
UFBA, Brasil.
Universidade Federal da Bahia.



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



Anibal de Freitas Junior
Doutor em Química pela Universidade Federal da Bahia,
UFBA, Brasil.
Universidade do Estado da Bahia.



DEDICATÓRIA

*Dedico esse trabalho aos meus pais **Ércio e Jacira**, meus irmãos **Thiago e Cibelle** e meus sobrinhos **Davi, Clara e Lucas**, sou eternamente grata a vocês por toda a compreensão, preocupação, incentivo, apoio e amor e, em especial, a minha mãe, que sempre acreditou em mim e não me deixou perder a esperança, meu grande exemplo de vida, dedico, mais esta conquista como forma de gratidão.*

" E aprendi que se depende sempre de tanta, muita, diferente gente. Toda pessoa sempre é as marcas das lições diárias de outras tantas pessoas. E é tão bonito quando a gente entende que a gente é tanta gente onde quer que a gente vá. E é tão bonito quando a gente sente que nunca está sozinho por mais que pense estar"

Gonzaguinha

AGRADECIMENTOS

Não há como deixar de agradecer à minha família (pais, irmãs e sobrinhos) por todo o apoio incentivo e carinho. Os valores ensinados desde criança, de que só o estudo pode nos levar a algum lugar, hoje fazem tanto sentido.

A **Valdenir e Mileide** obrigada pela acolhida e pelos momentos incríveis, tornando mais leve essa caminhada.

Um obrigado especial a Tino e Tati, as duas primeiras pessoas que conheci quando entrei no mestrado e hoje tenho orgulho de dizer que tenho os dois como amigos. Levo tudo o que aprendi com vocês para o resto da vida.

Aos meus amigos **Mayra, Juliana, Jamile, Joana, Jarbas, Lena, Franciele, Ronaldo, Eduardo, Michele, Leticia, Tatiane, Jonatas e Alex**, por dividir alegrias, angustias, cachaças, conquistas, lamentações e tristezas, a vocês serei eternamente grata!

A minha orientadora, professora **Lidércia Cavalcanti**, obrigada pela imensa paciência, pela confiança em me aceitar como orientada e pelos valiosos ensinamentos.

Ao meu Co-orientador **Ademir do Vale** agradeço toda a disposição de tempo, empenho, ensinamentos e paciência.

Ao professor **Anibal Junior** pelas valiosas contribuições que foram dadas a este trabalho.

Ao professor **Mileno Mota** por toda disponibilidade e ajuda.

Algumas pessoas marcam a nossa vida para sempre, umas porque nos vão ajudando na construção, outras porque nos apresentam projetos de sonhos e outras ainda porque nos desafiam a construí-los, nesse contexto agradeço aos meus eternos Mestres Albertino Freitas, Jota e Vitor.

A todos os colegas, e acima de tudo, amigos dos laboratórios de Farmacotécnica e de Produtos Naturais ambos da Faculdade de Farmácia obrigado pelo incentivo, carinho e amizade.

A **Neilson** pela ajuda com materiais essenciais para a pesquisa e a quem eu conto sempre com ajuda, conselhos e admiro a cada dia mais.

Enfim, a todos que estiveram ao meu lado durante essa caminhada.

Souza, Ércia Xavier Novais. Desenvolvimento e avaliação de lipossomas com bioativos de uva (*Vitis vinifera*) para medicamentos e cosméticos. 88 f. il. 2015. Dissertação (Mestrado). Instituto de Ciências da Saúde. Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2015.

RESUMO

A vitivinicultura no Brasil é concentrada nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste, sendo uma atividade consolidada e com significativa importância sócio-econômica. Na Bahia apresenta expressão econômica principalmente na região do Vale do São Francisco. As uvas são consideradas uma das maiores fontes de compostos fenólicos dentre os vegetais e frutas. A fabricação de vinhos e sucos gera grandes quantidades de resíduos sólidos, como o bagaço de uva, os quais são descartados ou subaproveitados. Esse resíduo apresenta uma composição rica e heterogênea de compostos fenólicos, o que é interessante do ponto de vista econômico. O desenvolvimento de sistemas emulsificados envolvendo nanoformulações é uma alternativa para melhorar a disponibilidade biológica de substâncias ativas. Estas vantagens podem ser empregadas na veiculação de bioativos em produtos farmacêuticos ou cosméticos, principalmente para os cuidados com a pele. O objetivo deste trabalho foi encapsular em lipossomas os extratos de uva *in natura* e residual com o intuito de determinar e comparar os efeitos do processamento e da natureza sobre a composição, estabilidade, propriedades organolépticas e atividade antioxidante entre as amostras obtidas. Os teores dos compostos fenólicos e flavonóides foram determinados por espectroscopia no ultravioleta visível (UV-VIS), bem como através de tratamento quimiométrico de análise de componentes principais (PCA). A atividade antioxidante (AA) foi avaliada pelo método de sequestro de radicais livres DPPH. Os lipossomas obtidos através da técnica de extrusão mostraram-se estáveis quanto às propriedades organolépticas (odor, cor, aspecto), físicas, físico química tanto para as amostras obtidas da uva *in natura* quanto para dos resíduos. As amostras apresentaram AA comparável ao padrão hidroxitolueno butilado (BHT), o lipossoma de uva *in natura* demonstrou o maior IC50. Os teores de compostos fenólicos e flavonóides foram maiores nas amostras derivadas do resíduo, tanto no extrato quanto nos lipossomas. Na PCA permitiu prever a similaridade e a preservação das características químicas nos lipossomas obtidos. Os resultados mostraram o potencial de aplicação dos extratos de uva *in natura* e residual no desenvolvimento de sistemas lipossomados com atividades antioxidantes em promissores produtos bioativos.

Palavra – chave: Uva, Resíduo Industrial, Lipossomas, Compostos Fenólicos, Atividade antioxidante, PCA.

Souza, Ércia Xavier Novais. Development and evaluation liposomes with bioactive grape (*Vitis vinifera*) for medicines and cosmetics. 88 f. il. 2015. Thesis (MS). Institute of Health Sciences. Federal University of Bahia, Salvador, 2015

ABSTRACT

The Viniculture in Brazil is concentrated at the South, Southeastern and Northeast region, being a consolidated activity and with significant socioeconomic importance. In the state of Bahia presents economic expression mainly in the region of the São Francisco Valley where the most of the production of grapes are designed to elaboration of Table Wines. The grapes are considered one of the biggest phenolic compounds sources among vegetables and fruits. The manufacture of wines and juices generates great amounts of solid residues, as the grape bagasse, which is discarded or partially tapped, this residue presents a rich and heterogeneous composition of phenolic composites, and it is very interesting of the economic point of view. The development of emulsified systems involving nanoformulations is an alternative to improve the bioavailability of active substances. These advantages can be employed in serving bioactive in pharmaceutical and cosmetic products, mainly for skin care. The objective of this work was the encapsulation of in nature grape extracts in liposomes and residual in order to determine and compare the effects of processing and the nature of the composition, stability, organoleptic properties and antioxidant activity of the samples obtained. The content of flavonoids and phenolic compounds were determined by UV-VIS spectroscopy as well as by chemometric treatment principal component analysis (PCA). The antioxidant activity (AA) was evaluated for the kidnapping method of free radicals DPPH. The liposomes obtained by extrusion technique were stable as the organoleptic properties (smell, color, appearance), physical and physicochemical both for samples obtained grape in nature and for residue. The samples showed AA comparable to BHT, liposome of in nature grapes demonstrated higher IC₅₀. The content of flavonoids and phenolic compounds were higher in samples derived of residue, both to the extract and to the liposomes. PCA allowed to predict the similarity and the preservation of the chemical characteristics obtained on the liposomes. The results showed the potential application of in nature grape extracts and residual developing using liposome systems with antioxidant activities in promising bioactive products.

KEYWORDS: Grape, Industrial residue, Liposomes, Phenolic compounds, Antioxidant activity, PCA.

Lista de Figuras

Figura 1	-Classificação geral dos compostos fenólicos (Fonte: ZAMORA, 2003 - Modificado)	22
Figura 2	-Principais substâncias fenólicas presentes nos vinhos. Fonte: SAGRATINI et al, 2012; MATSUBARA; RODRIGUEZ-AMAYA, 2006.	24
Figura 3	-Classificação dos lipossomas quanto ao tamanho e número de lamelas (Modificado de SHARMA; SHARMA,1997)	31
Figura 4	-Esquema para encontrar as raízes características que formarão os autovetores. Fonte: SOUZA, 2000	36
Figura 5	-Gráfico scree plot (cotovelo) para uma análise de componentes principais. Fonte: ROSENBERG, 1965.	37
Figura 6	-Liquidificador industrial (Vitalix LQI-04) B-Percolador	42
Figura 7	-Fluxograma de obtenção do extrato de uva residual	43
Figura 8	-Fases A-D- Sistema de extrusão	44
Figura 9	-Reação genérica entre o radical livre DPPH e um antioxidante	47
Figura 10	-Fotomicrografia dos Lipossomas contendo uva <i>in natura</i> (A) e resíduo de uva (B) em um aumento de 40 vezes	52
Figura 11	-Atividade antioxidante do BHT	59
Figura 12	-Atividade antioxidante do lipossoma de uva <i>in natura</i>	59
Figura 13	- Atividade antioxidante do lipossoma de uva residual	60
Figura 14	-Atividade antioxidante do extrato de uva <i>in natura</i>	60
Figura 15	- Atividade antioxidante do extrato de uva residual	61
Figura 16	-Porcentagem de sequestro de Radicais Livres nas amostras BHT, EUR, EUN, LUR e LUN	62
Figura 17	-Curva padrão da quercetina	65
Figura 18	-Flavonóides totais expressos em mg ⁻¹	65
Figura 19	-Curva de Calibração de ácido gálico	67
Figura 20	-Fenólicos totais expressos em mg AG-1	68
Figura 21	-Espectro de absorvância de 350 a 700 nm de (a) extrato de uva natural e ácido gálico; (b) extrato de uva residual e ácido gálico; (c) Lipossoma natural e ácido gálico; (d) Lipossoma residual e ácido gálico	70
Figura 22	-Gráfico de Autovalor x PC	71
Figura 23	-PC1xPC2 de espectros de absorção no UV-VIS para amostras de EUR, EUN, LUN, LUR. As siglas com 'referem-se a amostra com adição de ácido gálico.	73
Figura 24	-Curva de calibração de ácido gálico para as amostras: (a) EUN, (b) EUR, (c) LUN e (d) LUR	74

Lista de tabelas

TABELA 1.	Amostras avaliadas	46
TABELA 2.	Composição volumétrica das soluções obtidas com as amostras dos extratos e aditivadas com os padrões de ácido gálico para a PCA	50
TABELA 3.	Valores de pH em diferentes períodos a $25 \pm 20C$	54
TABELA 4.	Valores de pH em diferentes períodos a $-5 \pm 20C$	54
TABELA 5.	Valores de pH em diferentes períodos a $35 \pm 20C$	55
TABELA 6.	Características organolépticas a $25 \pm 20C$	57
TABELA 7.	Características organolépticas a $-5 \pm 20C$	57
TABELA 8.	Características organolépticas a $35 \pm 20C$	58
TABELA 9.	Atividade antioxidante dos sistemas lipossomados e dos extratos	61
TABELA 10.	Porcentagem de Variância capturada pelo modelo PCA	71
TABELA 11.	Leituras observadas para a adição de padrão na amostra EUN, EUR, LUN E LUR, em comprimento de onda de 485 nm	73
TABELA 12.	Equação da reta para as amostras EUR,EUN,LUR,LUN	75

Lista de Abreviatura e siglas

AA- Atividade antioxidante
BHT- Hidroxitolueno butilado
CP- Componente principal
DPPH-2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazy
EUN- Extrato de uva natural
EUR-Extrato de uva residual
LUN -Lipossoma de uva natural
LUR- Lipossoma de uva residual
PCA-Análise do componente principal
UV-VIS -Ultravioleta visível

Sumário

1.	INTRODUÇÃO	15
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	Uva	17
2.1.1	Subprodutos do processamento da uva	19
2.2	Compostos bioativos em uvas	20
2.3	Atividade antioxidante	26
2.4	Nanotecnologia	28
2.5	Lipossomas	29
2.6	Quimiometria	34
3.	OBJETIVOS	39
3.1	Objetivo geral	39
3.2	Objetivos específicos	39
4.	MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1	Material	40
4.1.1	Equipamentos	40
4.1.2	Reagentes e solventes utilizados	40
4.1.3	Substâncias químicas de referência padrão	41
4.2	Amostras	41
4.3	Obtenção dos extratos	41
4.3.1	Extrato de uva <i>in natura</i>	41
4.3.2	Extrato de resíduo da uva	42
4.4	Obtenção dos sistemas lipossomais	43
4.4.1	Sistema de extrusão –lipossoma de uva <i>in natura</i> a 5%	43
4.4.2	Sistema de extrusão –lipossoma do resíduo da uva	45
4.5	Avaliação dos extratos e dos sistemas nanoencapsulados da uva <i>in natura</i> e do resíduo	45
4.5.1	Microscopia Óptica	45
4.6	Avaliação da estabilidade física	45
4.6.1	Ensaio de estabilidade –teste de prateleira	45
4.6.2	Características organolépticas	46
4.6.3	Avaliação do potencial hidrogeniônico (pH)	47
4.7	Avaliação da capacidade antioxidante dos extratos e dos lipossomas	47
4.8	Avaliação do conteúdo fenólico totais	48
4.9	Determinação dos flavonoides totais	49
4.10	Análise do componente principal (PCA)	50
4.10.1	Preparo da solução padrão intermediária de ácido gálico	50
4.10.2	Preparo das amostras para o PCA	50
4.10.3	Espectroscopia UV-VIS e PCA	50
5.0	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1	Microscopia óptica	52
5.2	Avaliação do potencial hidrogeniônico (Ph)	53
5.3	Ensaio da estabilidade física	55
5.4	Atividade antioxidante dos lipossomas e dos extratos (puro e residual)	58
5.5	Determinação dos flavonóides totais	64
5.6	Determinação dos fenólicos totais	67
5.7	Espectro de absorção UV-VIS	69
5.8	PCA dos espectros de absorção no UV-VIS das amostras	71
5.9	Análise univariada das amostras	73

6.	CONCLUSÃO	76
7.	REFERÊNCIAS	78

1. INTRODUÇÃO

A videira é uma trepadeira da família Vitaceae, cujo fruto é a uva (SOUZA, 2008). É uma das frutas mais consumidas no mundo, seja na forma “*in natura*” ou na forma processada, sendo considerada como uma importante fonte de compostos ativos benéficos à saúde humana (ORAK, 2007; SHRIKHANDE, 2000).

A fruta da videira possui diversos compostos bioativos, dentre eles os polifenóis, com atividades antioxidantes que atuam como redutores de oxigênio singlete. Estudos recentes evidenciaram que os antioxidantes fenólicos de cereais, vegetais e frutas contribuem positivamente, na redução da incidência de doenças degenerativas e crônicas. A uva e seus derivados possuem propriedades antimicrobianas, anti-inflamatória, antialérgicas, antiarteriogênicas, antitrombóticas e, ainda, efeitos cardioprotetores (ROESLER *et al.*, 2007).

A vitivinicultura tropical destinada à produção de vinhos e outros derivados da uva tem se tornado uma importante fonte na geração de emprego e renda, sendo evidenciada como um importante segmento da fruticultura brasileira nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste (MOURA *et al.*, 2009). A produção brasileira de vinhos em regiões tropicais tem mobilizado distintas instituições de pesquisa e desenvolvimento: Embrapa Semi-Árido, Embrapa Uva e Vinho, Financiadora de Estudos e Projeto - FINEP, e Instituto do Vinho do Vale do São Francisco. A região do Vale São Francisco iniciou a produção comercial na década de 1980 (TONIETTO; CAMARGO, 2006).

O Submédio do Vale do São Francisco é formado pelos municípios de Casa Nova, Curaçá e Juazeiro, no Estado da Bahia, e Petrolina, Lagoa Grande e Santa Maria da Boa Vista, localizados no Estado de Pernambuco. Nessa região, a uva se destaca como uma das principais frutas de exportação brasileira. De acordo com Moura e colaboradores (2009), a produção de uva nessa região ocorre durante todo o ano, o que é possível devido ao clima semiárido, com forte insolação, temperatura média anual entre 23 °C a 27 °C e umidade relativa média em torno de 50%.

De acordo com Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (BRASIL, 2014) a região é um dos grandes polos Nacionais em produção de uva. A produção de videira no Brasil, entre os anos de 2013 e 2014, cresceu 1,5% em áreas plantadas. De acordo com levantamento sistemático da produção agrícola do país, no Nordeste, em 2013 foram produzidas 282.199 toneladas de uva e 282.450 toneladas em 2014.

O Nordeste, no ano de 2014 foi responsável por 19,7% da produção nacional de uva, o Estado do Pernambuco sozinho produziu 15,9% e Bahia 3,7% (BRASIL, 2014).

As características do Vale do Submédio São Francisco, são favoráveis ao cultivo da uva (MOURA *et al.*, 2009). Nessa região, dentre as espécies de uva, a mais cultivada é a *Vitis labrusca*. Esse tipo de uva é utilizada como alimento e na produção de sucos e vinho de mesa, devido a suas características sensoriais de aroma, equilíbrio açúcar/acidez. Não é recomendada para produção de vinhos finos, visto que possui baixo teor de sólidos solúveis totais quando comparado a outras variedades das *Vitis vinífera* (RIZZON; MENEGUZZO, 2007). Por outro lado, as uvas viníferas (*Vitis vinífera*), produzem vinhos com melhor qualidade e sabor, sendo economicamente interessantes. As variedades *Cabernet Sauvignon*, *Carmenère*, *Chardonnay*, *Merlot*, *Tempranillo*, *Pinotage* são algumas das uvas viníferas mais produzidas no Brasil (KUHN *et al.*, 1996).

Na vinificação o principal subproduto é o resíduo, constituído basicamente de casca e semente (SILVA, 2005). Muitos desses resíduos contêm compostos utilizados no combate aos danos causados por radicais livres, como é o caso dos antioxidantes que possuem elevado valor comercial (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006). A depender do processo de fabricação do vinho a concentração de resveratrol, ácido linoleico, ácido palmítico e outros compostos permanecem no bagaço em maior ou menor quantidade (CAMPOS, 2005).

Esses bagaços, provenientes da viticultura, representam um problema ambiental devido ao seu elevado volume, aproximadamente 20% do processo total, e a suas características poluentes (BUSTAMANTE *et al.*, 2008). A maior parte do bagaço produzido pelas vinícolas é desperdiçada. É de suma importância que ocorra uma exploração desses subprodutos uma vez que possuem propriedades alimentícias, fitoterápicas e químicas, permitindo assim que seja agregado valor a este resíduo industrial, que geralmente é descartado (CAMPOS, 2005).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Uva

A parreira é uma planta tipo trepadeira, pertencente à família Vitaceae, com tronco retorcido, ramos flexíveis, folhas grandes e repartidas, flores esverdeadas, cujos frutos são carnosos e alcinhados de uvas (GIOVANNINI, 2005). O cacho da uva é composto basicamente de bagas e talo, as bagas possuem forma ovalada ou arredondada, com uma coloração específica para cada classe de uva, variando do verde amarelado ao vermelho azulado escuro. A pigmentação vermelha ou azul das bagas é encontrada apenas nas células exteriores da pele da uva, salvo algumas exceções como híbridos possuem pigmentação na polpa dos frutos (VOGT *et al.*, 1986).

As videiras pertencem ao gênero *Vitis*, principal gênero da família Vitaceae, é composta por 12 gêneros e cerca de 800 espécies. Dessas, mais de 60 espécies com capacidade de adaptação, podem ser encontradas em ambientes tropicais da América e da Ásia a regiões extremamente frias (CHOUDHURY *et al.*, 2001; SOUZA; LORENZI, 2008). O gênero *Vitis* agrupa as espécies de maior importância econômica e divide-se em dois subgêneros: *Muscadínea* (3 espécies) e *Eu vitis* (mais de 50 espécies). No subgênero *Eu vitis*, as espécies de grande importância econômica são as *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. utilizadas na produção de suco e vinho, ou como alimento na forma “*in natura*” (GIOVANNINI, 2008).

A espécie *Vitis labrusca*, originária da América, possui características mais rústicas quanto a suscetibilidade a doenças, além de ser utilizada pela viticultura em regiões inaptas às castas mais nobres. A *Vitis vinifera*, originária da Europa, é uma das plantas frutíferas de uso mais antigo na alimentação humana, com elevada importância econômica, constitui a base da vitivinicultura mundial, sendo responsável por mais de 90% dos vinhos fabricados no mundo. Além disso, seus vinhos são considerados nobres (GIOVANNINI, 2008; CAMARGO; OLIVEIRA, 2001).

A videira (*Vitis vinifera* Linnaeus) chegou ao Brasil em 1532, originária da Ilha de Madeira, Açores e outras partes do Reino Português e foi introduzida na Capitania de São Vicente, atualmente Estado de São Paulo, por Brás Cubas (considerado o primeiro viticultor Brasileiro) (GIOVANNINI, 2005). A vitivinicultura Brasileira teve seu desenvolvimento baseado em uvas americanas, conhecidas como uvas comuns,

pertencentes as espécies *Vitis labrusca* e *Vitis bourquina*, utilizadas no preparo de vinhos de mesa. Após meados do século XX com a utilização de uvas da variedade *Vitis vinífera*, denominadas de uvas finas teve início a produção de vinhos finos (CAMARGO, 2009).

A implantação da viticultura no Vale do Submédio do São Francisco, localizado nos Estados de Pernambuco e Bahia, foi iniciada na década de 50. Durante os anos de 1963 e 1964 foi iniciada a construção de dois campos irrigados: Bebedouro, em Petrolina-PE e Mandacaru, em Juazeiro - BA, ambos inaugurados em 1968; durante essa época as uvas de mesa começaram a ser introduzidas nesses locais (LEÃO; POSSÍDIO, 2000).

A sensibilidade a doenças das uvas viníferas (*Vitis vinifera* L.) ocasionou a restrição do seu cultivo a algumas regiões vitivinícolas brasileiras a exemplo do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Vale do Rio São Francisco. A produção Brasileira de uva é composta, basicamente, pelas variedades *Cabernet Sauvignon*, *Carmenère*, *Chardonnay*, *Gewürztraminer*, *Merlot*, *Pinotage*, *Pinot Noir*, *Sauvignon Blanc*, *Syrah*, *Tannat*, *Tempranillo*, *Teroldego*, *Verdelho* e *Viogneir* (KUHN *et al.* 1996). A *Tempranillo* originária da Espanha, também é conhecida como Aragonez ou Tinta Roriz em Portugal, vem sendo cultivada em diversas regiões do mundo, principalmente na Península Ibérica (CHILE, 2006). No Vale do São Francisco, foi recentemente instalada e vem apresentado bons resultados na elaboração de vinhos tintos (PEREIRA *et al.*, 2009).

Em 2014 o Brasil totalizou uma produção de 1.437.245 toneladas de uva, sendo os maiores produtores nacionais os estados do Rio Grande do Sul, São Paulo e Pernambuco (BRASIL, 2014). No Nordeste os maiores produtores são os estados do Pernambuco, Bahia e Ceará. As produções conjuntas destes estados representam aproximadamente 9.686 mil hectares de área cultivada, o que representa cerca de 12,3 % da área total produtora do país (BRASIL, 2014).

2.1.1 Subprodutos do processamento da uva

A uva é uma das frutas mais produzidas no mundo, as estimativas apontam que anualmente são produzidas em todo o mundo, cerca 61 milhões de toneladas. Aproximadamente 80% dessa produção, são destinados à fabricação de vinho. Dessa produção de vinho, aproximadamente 20% é constituída pela massa do bagaço, gerada pelo processamento, resultando em uma produção anual de 9 milhões de toneladas de resíduo vinícolas (MELO *et al.*, 2011).

A extensa atividade agrícola Brasileira, gera um elevado volume de resíduos agroindústrias e a busca por alternativas viáveis para utilização dessa matéria orgânica tem elevado o interesse de diversos centros de pesquisas. A indústria e os produtores da área vinícola possuem empecilhos no descarte dessa biomassa residual, que mesmo biodegradável precisa de um tempo mínimo para mineralização, considerada fonte de poluentes ambientais (CATANEO *et al.*, 2008).

No Brasil, um grande volume desse resíduo industrial é considerado de baixo valor econômico, sendo utilizado, na maioria das vezes, como ração animal (ROCKENBACH *et al.*, 2011). Os subprodutos e resíduos das vinícolas podem conter substâncias que agregam valores, cuja recuperação vem despertando interesse econômico e ambiental, dentre eles as substâncias tartáricas, leveduras de fermentação, compostos inorgânicos e compostos fenólicos (SILVA, 2003), etanol e o óleo da semente da uva (BAGCHI *et al.*, 2000; SHRIKHANDE, 2000).

Os compostos fenólicos são acumulados em grande parte nas sementes e cascas de uvas, por esse motivo, o extrato obtido do bagaço de uva tem sido recentemente utilizado para a obtenção de ingredientes funcionais como antioxidantes naturais e suplementos alimentares (BAGCHI *et al.*, 2000; SHRIKHANDE, 2000; XU *et al.*, 2010). Uma possível redução do risco de doenças através da dieta tem despertado o interesse acadêmico e das indústrias alimentícias com o objetivo de desenvolver “alimentos funcionais”, ou alimentos ricos em um ou mais compostos bioativos que apresentam efeitos benéficos na saúde (PINTO, 2008). O alimento de origem vegetal contém compostos não nutrientes (fitoquímicos ou compostos bioativos) que possuem atividades biológicas favoráveis a saúde, como antioxidante, anti-inflamatória, hipocolesterolêmica (ROESLER *et al.*, 2007).

Considerando as questões ambientais e a potencialidade dos resíduos provenientes de vinicultura como fonte de compostos bioativos torna-se necessário a realização de estudos que utilizem desse material na produção de compostos que possam ser aplicados nas indústrias farmacêuticas, cosmética e alimentícia (BONILLA *et al.*, 1999; HOGAN *et al.*, 2010).

2.2 Compostos bioativos em uvas

A alimentação diária, além de fornecer micros e macros nutrientes essenciais, proporciona a ingestão de alguns compostos químicos presentes em hortaliças e frutas, que exercem atividade de proteção biológica. Esses compostos bioativos ou fitoquímicos podem desempenhar diversas atividades benéficas a saúde humana (CARRATU; SANZINI, 2005).

No reino vegetal, as substâncias fenólicas estão largamente distribuídas, fazendo parte da dieta humana (SOARES, 2002). Os vegetais constituem uma vasta e importante fonte de produtos naturais que possuem atividade antioxidante. As plantas podem possuir uma grande variedade de moléculas sequestrantes de radicais livres, a exemplo de compostos fenólicos como fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas. Dentre as distintas classes de substâncias antioxidantes de ocorrência natural, o composto fenólico vem despertado muita atenção nos últimos anos, sobretudo devido ao fato de inibirem a peroxidação lipídica e a lipooxigenase *in vitro* (HASLAM, 1996; SOARES, 2002).

Na uva os compostos fenólicos provem do metabolismo secundário e desempenham funções de defesa, pigmentação e atração de seres polinizadores (YILMAZ; TOLEDO, 2004); (PÉREZ-JIMÉNEZ, 2007). As videiras sintetizam esses compostos quando submetidas a estresses bióticos (defesa patogênica) ou abióticos (incidência de radiação ultravioleta, temperaturas extremas, déficit hídrico etc) (CANTOS *et al.*, 2000).

A composição química da uva é determinada pelo potencial genético, estágio de maturação, manejo e pelo clima (PEIXOTO, 2000). A produção, o desenvolvimento e a qualidade das uvas destinadas a produção de vinhos, são influenciadas diretamente por fatores meteorológicos a exemplo de temperaturas, radiação solar,

umidade ao longo de todos os estádios fenológicos da videira. Cada um destes estádios fenológicos necessita de quantidade de luz adequada, água e calor para que a videira se desenvolva e produza frutos de qualidade (GUERRA *et al.*, 2005).

A evolução dos compostos fenólicos é diferente em cada região e em cada safra, pois depende da variedade, do clima, do solo, das práticas culturais e do grau de maturação da uva sendo um fator importante na determinação da qualidade da uva. As antocianinas, por exemplo, apresentam-se com maior intensidade durante a fase final da maturação (GIOVANNINI, 2005). As uvas de coloração mais escura possuem elevado índices de atividade antioxidante e compostos fenólicos (ABE *et al.*, 2007). Os compostos fenólicos estão presentes principalmente nas sementes e cascas das bagas (GIOVANNINI, 2005). A semente possui fibra, óleo, proteína, compostos fenólicos complexos (taninos), açúcares e sais minerais. A casca da uva contém antocianidinas e antocianinas, que são corantes naturais com propriedades antioxidantes inibidores da lipoperoxidação e com atividades antimutagênicas (MURGA *et al.*, 2000).

Esses compostos fenólicos são caracterizados através da presença de estruturas com anéis aromáticos contendo duplas ligações conjugadas, a partir das quais exercem ações antioxidantes (PÉREZ-JIMÉNEZ, 2007). Existem dois grandes grupos de compostos fenólicos na uva ; os não flavonóides e os flavonóides (Figura 1). As diferenças de estrutura entre ambos os grupos consistem principalmente que os não flavonóides têm um único anel, enquanto que os flavonóides são formados por dois anéis aromáticos unidos por uma cadeia de três átomos de carbono (ÁVILA, 1999).

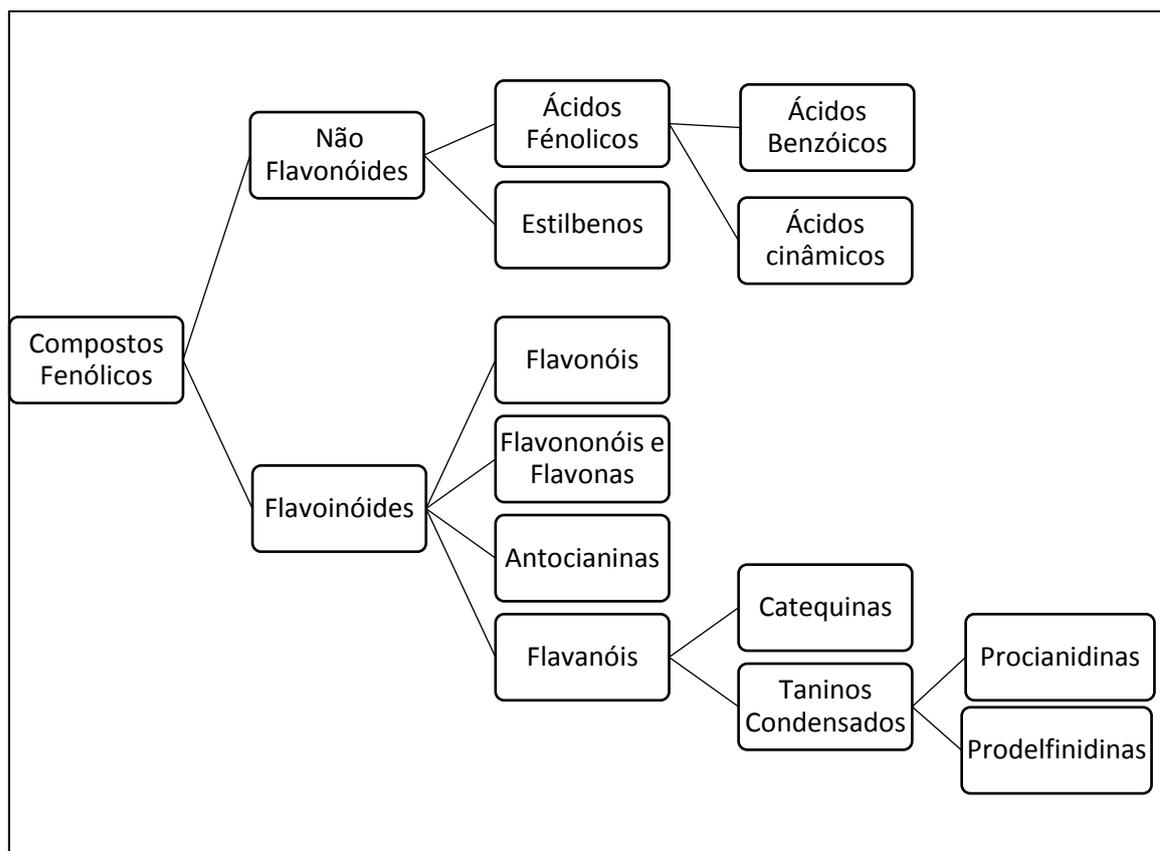


Figura 1 - Classificação geral dos compostos fenólicos (Fonte: ZAMORA, 2003 -Modificado)

De acordo com a sua estrutura, os flavonóides podem ser divididos em sub-grupos: flavonas (apigenina, luteolina), flavanóis (catequina, epicatequina, taninos condensados), flavonóis (quercetina, miricetina), flavanonas (hesperidina, naringenina), isoflavonas (genesteína, daizeína) e antocianidinas (FERREIRA; ABREU, 2007). Estes compostos podem existir livres ou em polímeros com outros flavonóides, não flavonóides, açúcares, ou em uma combinação destes (JACKSON, 2008).

Os flavonóides atuam na proteção dos vegetais contra vírus, insetos, fungos e bactérias, incidência de raios ultravioletas e visíveis e na atração de animais com finalidade de polinização e no controle da ação de hormônios vegetais (ZUANAZZI; MONTANHA, 2004). Esses compostos são inseridos na alimentação através de alimentos, tais como: cerveja, chá verde, chá preto, vinho, verduras, soja e frutas. De fato, compostos fenólicos são importantes durante o processo de fabricação de vinho, pois é das antocianinas e taninos que depende grande parte da qualidade organoléptica geral de vinhos tintos (GABBARDO, 2009).

Nas uvas e seus derivados, frequentemente são encontrados os flavanóis (catequina, epicatequina e epigallocatequina), flavonóis (kaempferol, quercetina e miricetina) e antocianinas, todos bem conhecidos por suas fortes ações biológicas (XIA *et al.*, 2010; ZHU *et al.*, 2012; KY *et al.*, 2014).

A Figura 2 representa as estruturas químicas das substâncias fenólicas encontradas, mais comumente, nos vinhos.

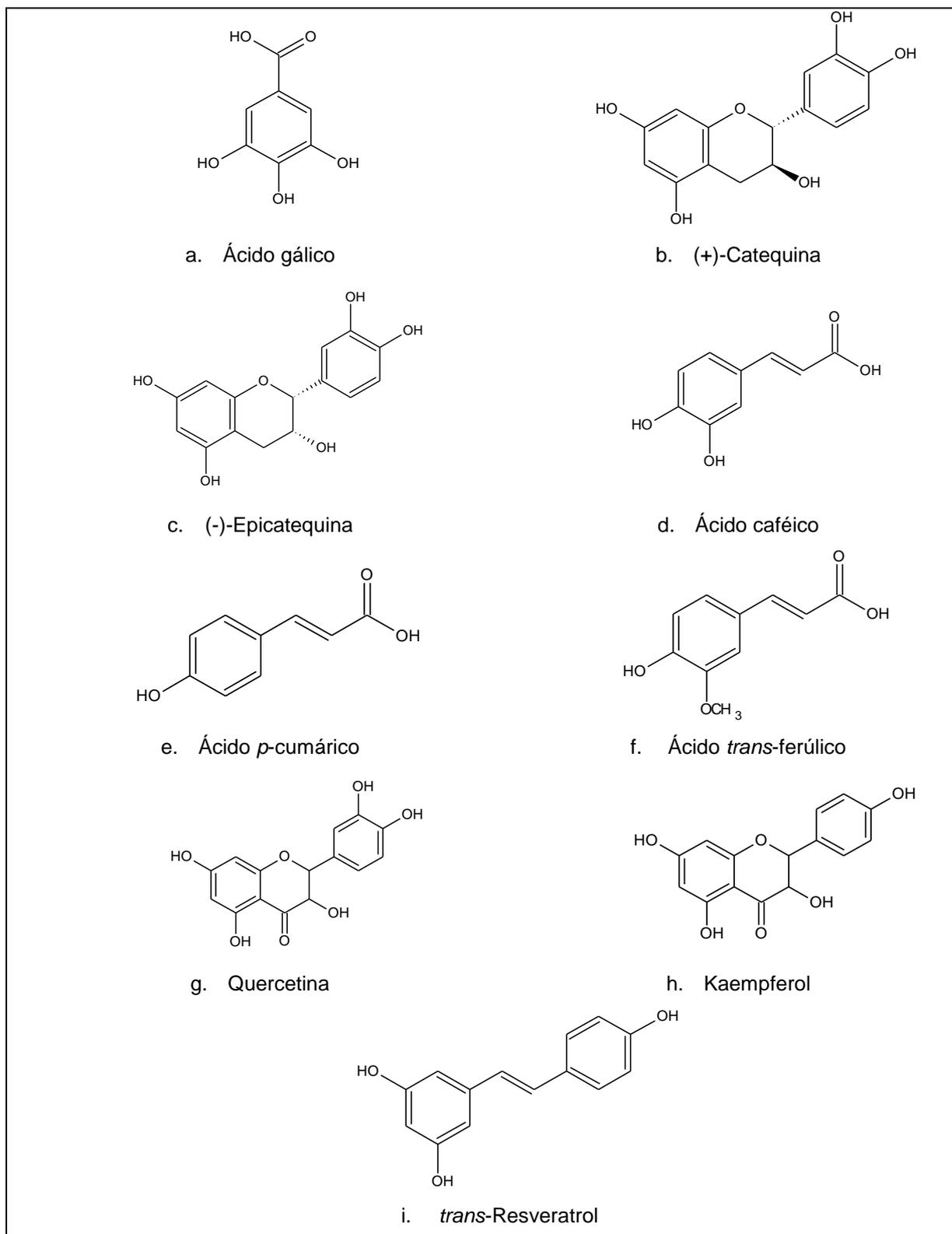


Figura 2 - Principais substâncias fenólicas presentes nos vinhos. Fonte: SAGRATINI et al, 2012; MATSUBARA; RODRIGUEZ-AMAYA, 2006.

As uvas da espécie *Vitis vinifera*, possuem flavonóides do tipo taninos condensados, que são compostos pela catequina, epicatequina, galocatequina e procianidinas encontradas em maior quantidade nas sementes, na película e no engaço da uva, estão associados às características organolépticas de adstringência, cor, estrutura e amargor. A isomeria destes compostos influencia estas características, sendo a catequina mais adstringente do que a epicatequina (WATERHOUSE *et al.*, 2000; MASCARENHAS, 2009). Esses flavonóides são compostos por pigmentos amarelos encontrados principalmente na película, ligados aos açúcares e ao ácido glucorônico, enquanto a quercetina encontra-se nas uvas da espécie *Vitis labrusca* e o kaempferol nas *Vitis vinífera* (MASCARENHAS, 2009).

Entre os não flavonóides, destacam-se dois grupos, o primeiro inclui os estilbenos representados pelo resveratrol. O segundo é composto por inúmeros ácidos fenólicos designados de: ácido gálico, ácido elágico, derivados dos ácidos hidroxibenzóico e hidroxicinâmico (ácido caféico, ferúlico, caftárico e cumárico) (MASCARENHAS, 2009). O ácido gálico é derivado do ácido benzoico sendo encontrado na natureza geralmente na forma de seu dímero de condensação, o ácido elágico (CARVALHO *et al.*, 2001); O ácido caféico é um dos compostos mais encontrados em vinhos brancos, possui atividade antibacteriana e antiviral, é um inibidor da enzima lipoxigenase, que está relacionada com a biossíntese de leucotrienos e prostaglandinas (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2003; TRUEBA; SANCHEZ, 2001).

Tanto em *Vitis vinifera* como em *Vitis labrusca*, os estilbenos, estão presentes em maior quantidade nas cascas não sendo encontrados nas sementes. O resveratrol é um estilbeno presente principalmente em vinhos tintos. Devido ao fato de ser uma das fitoalexinas responsáveis pela resposta imune da planta a ataques de fungo a sua quantidade é dependente do nível de estresse sob o qual se encontrava a videira durante a produção do fruto (FLANZY, 2003). O resveratrol apresenta propriedades antioxidante, antiaterogênica e apoptótica (YILMAZ; TOLEDO, 2004). A atividade antioxidante do resveratrol ocorre através da inibição da atividade dioxigenase da lipoxigenase (PINTO *et al.*, 1999). A atividade antiinflamatória do resveratrol é decorrente da inibição da transcrição e atividade da ciclooxigenase (COX-1 e COX-2), inibindo também a síntese de tromboxinas, atuando também como anticoagulante (SUBBARAMAIAH *et al.*, 1998).

2.3 Atividade antioxidante

Antioxidante é qualquer substância que, mesmo quando presente em baixas quantidades quando confrontado com o substrato oxidável, atua na prevenção ou redução da oxidação deste substrato (BENZIE, 1996). A atividade antioxidante é uma propriedade empregada para reduzir a ação dos radicais livres, ajudando a minimizar os efeitos do estresse e da falta de oxigênio, formando complexos que atenuam as reações produtoras de radicais livres (ALLEN; HAMILTON, 1983).

Os radicais livres atuam no organismo sintetizando importantes substâncias biológicas, produzindo energia, regulando o crescimento celular e na sinalização intercelular. A ocorrência de uma produção excessiva de radicais de oxigênio durante os processos fisiopatológicos ou devido a fatores ambientais adversos atrelada a indisponibilidade de antioxidantes *in vivo*, pode ocasionar patologias e danos aos tecidos como envelhecimento precoce, doenças cardiovasculares, danos aos ácidos desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA), caso ocorra o rompimento da cadeia de DNA, esta pode ser reconectada em outra posição, ocasionando a inversão da ordem de suas bases levando ao surgimento de câncer, entre outras doenças (ALVES *et al.*, 2010); (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

A oxidação é descrita como sendo a conversão de uma substância química em um derivado com menor número de elétrons, portanto é a perda de um ou mais elétrons para outra substância; O procedimento inverso é considerado redução (ALVES *et al.*, 2010). Constitui um processo importante no metabolismo das plantas e dos animais, os radicais livres são produzidos naturalmente em decorrência a disfunções biológicas ou devido processo de oxidação. Nestes radicais, o elétron desemparelhado encontra-se no átomo de oxigênio ou nitrogênio, sendo, portanto, estes radicais classificados como espécies reativas do oxigênio (ERO) ou espécies reativas do nitrogênio (ERN) (BARREIROS; DAVID; DAVID; 2006). Os processos oxidativos podem ser evitados através da modificação das condições ambientais ou pela utilização de substâncias antioxidantes com a propriedade de impedir ou diminuir o desencadeamento das reações oxidativas (ALLEN; HAMILTON, 1983).

Nos seres vivos, a produção de radicais livres é controlada através de diferentes compostos antioxidantes, que podem ser de origem endógena ou provenientes da alimentação e outras fontes como os tocoferóis (vitamina E), ácido

ascórbico (vitamina C) e polifenóis. Esses compostos possuem capacidade para estabilizar ou desativar os radicais livres antes do ataque aos alvos biológicos nas células (SOUSA *et al.*, 2007).

Os antioxidantes são capazes de inibir a oxidação de diversos substratos, de moléculas simples a polímeros e biosistemas complexos, por meio de dois mecanismos: o primeiro envolve a inibição da formação de radicais livres que possibilitam a etapa de iniciação; o segundo abrange a eliminação de radicais importantes na etapa de propagação, como alcoxila e peroxila, através da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia (NAMIKI, 1990; SIMIC; JAVANOVIC, 1994).

Antioxidantes fenólicos funcionam como sequestradores de radicais e algumas vezes como quelantes de metais (SHAHIDI *et al.*, 1992), agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os produtos intermediários, formados pela ação destes antioxidantes, são relativamente estáveis devido à ressonância do anel aromático apresentada por estas substâncias (NAWAR, 1985). Os compostos fenólicos e alguns de seus derivados são, portanto, eficazes para prevenir a oxidação lipídica (SHAHIDI *et al.*, 1992).

A quantidade excessiva de radicais livres é minimizada através da inclusão na dieta de antioxidantes na forma endógena ou exógena de antioxidantes. Dentre os diferentes antioxidantes exógenos existentes, são destacados os compostos fenólicos presentes em produtos naturais (BARREIROS *et al.*, 2006; SOARES, 2002). Nas indústrias alimentícias, a oxidação lipídica é bloqueada por sequestradores de radicais livres. As substâncias mais comumente utilizados para esta finalidade são os antioxidantes de origem sintética, dentre os quais o butilidroxianisol (BHA), butilidroxitolueno (BHT), *terc*-butilidroxiquinona (TBHQ), tri-hidroxibutilfenona (THBP) e galato de propila (GP). Evidenciou-se, em estudos, que esses antioxidantes apresentam efeitos tóxicos (SOUSA *et al.*, 2007). Como o aumento da formação de H₂O₂ nos microssomos, que ocasiona alterações nas funções hepáticas (ROSSING *et al.*, 1985).

Tendo em vista os indícios de problemas que podem ser provocados pelo consumo de antioxidantes sintéticos, as pesquisas têm-se dirigido no sentido de encontrar compostos naturais com atividade antioxidante os quais permitirão substituir os sintéticos ou fazer associações entre eles, com o intuito de diminuir sua

quantidade. Os estudos estão centralizados nos compostos fenólicos de origem vegetal, pois eles agem como aceptores de radicais livres, interrompendo a reação em cadeia provocada por estes, além de atuarem também nos processos oxidativos catalisados por metais, tanto *in vitro*, como *in vivo* (SOARES, 2002).

Para tanto, estratégias tecnológicas buscam investigar procedimentos para melhorar a eficácia da atividade antioxidante, dentre as quais, a veiculação dos compostos bioativos em sistemas encapsulados com a finalidade de favorecer a liberação eficiente quando estes forem aplicados nas estruturas biológicas com ação antioxidante.

2.4. Nanotecnologia

A nanotecnologia é uma ciência multidisciplinar que inclui conhecimentos da biologia, física, química, engenharia, matemática, computação e de outros ramos da ciência (DURÁN; MATTOSO; MORAIS, 2006). Consiste na habilidade de manipular a matéria em escala nanométrica, ou seja, uma escala que corresponde a 1 bilionésimo do metro ($1 \text{ nm} = 1/1.000.000.000 \text{ m}$) ou aproximadamente a distância ocupada por cerca de 5 a 10 átomos, dispostos de maneira a formar uma linha, com o objetivo de criar estruturas com uma organização molecular diferenciada o que pode favorecer o uso em estruturas complexas (PEREIRA *et al.*, 2006). Possui como foco a caracterização, fabricação, manipulação e aplicação de estruturas biológicas e não biológicas (SAHOO; PARVEEN; PANDA, 2007).

Na indústria de alimentos a nanotecnologia é empregada no desenvolvimento de novos materiais funcionais, desenvolvimento de novos produtos e nanossensores para a segurança alimentar (MORARU *et al.*, 2003). Diferentes estudos vêm demonstrando o potencial da nanotecnologia no setor farmacêutico, as pesquisas abrangem desde o diagnóstico e prevenção de patologias, a produção e desenvolvimento de cosméticos (PEREIRA *et al.*, 2006).

As nanopartículas possuem algumas características vantajosas que fazem delas carreadores promissores para aplicações tópicas, como a capacidade de proteção a compostos lábeis contra degradação química, possibilidade de controle da liberação da substância ativa e também por poder atuar como agentes oclusivos. No caso de aplicação tópica pode ser útil para melhorar a penetração de uma

substância e favorecer a liberação sustentada do ativo, especialmente importante para substâncias ativas com potencial irritante em concentrações elevadas ou que devam suprir a pele por um período prolongado de tempo (JENNING *et al.*, 2000).

Diferentes sistemas carreadores têm sido extensivamente estudados visando à liberação controlada do ativo e o possível aumento da eficácia e seletividade destes em formulações. Para isso, diferentes táticas tecnológicas têm sido propostas, dentre elas os sistemas nanométricos que é uma ótima opção para o carreamento de substâncias lipofílicas, pois facilitam a liberação homogênea do ativo. Carreadores coloidais de fármacos, incluindo as nanoemulsões, nanoesferas, nanocápsulas, lipossomas e complexos lipídicos, têm atraído um crescente interesse, sendo utilizados como veículos para administração tópica de fármacos lipofílicos, por permitir o controle da velocidade de cedência e do regime de dosagem das substâncias (VERMA *et al.*, 2003; SHIM *et al.*, 2004)

Dentre esses sistemas carreadores, os sistemas lipossomais são caracterizados por encapsular uma variedade de substâncias ativas, é considerado um principais sistemas nanoestruturados para carregamento de fármacos e vacinas (LASIC,1995).

2.5 Lipossomas

Os lipossomas são vesículas esféricas compostas por uma ou diversas bicamadas concêntricas de lipídios capazes de isolar um ou vários compartimentos aquosos internos do meio externo (FRÉZARD *et al.*, 2005). São de natureza anfótera, possuem uma fase externa com membranas fosfolipídicas e a fase interna constituída por um meio aquoso, podendo encapsular diferentes moléculas (FRÉZARD ,1999).

Os lipossomas convencionais possuem em sua composição fosfolipídios e colesterol, podem ainda possui cargas positiva ou negativa procedente de outros fosfolipídios ou surfactantes utilizados para aumentar a estabilidade, a biodisponibilidade e para evitar a agregação de vesículas (LIRA *et al.*, 2009). Os lipossomas podem proteger o material encapsulado da degradação enzimática possibilitando o aumento das concentrações destes no sitio alvo, e prolongar o tempo da vesícula na circulação, permitindo um possível direcionamento para sítios específicos de células ou órgãos (GREGORIADIS, 2007).

Uma das limitações apresentadas pelos lipossomas é a rápida liberação no sangue, gerado pela adsorção de proteínas do plasma (opsoninas) com a membrana fosfolipídica, e o reconhecimento e captação dos lipossomas pelo sistema fagocítico mononuclear (SFM) (GREGORIADIS, 2007). Os lipossomas convencionais *in vivo* quando reconhecidos pelo sistema fagocitário mononuclear, são rapidamente removidos da circulação o que acarreta limitação a sua aplicação a locais específicos, mas não inviabiliza a sua aplicação. Os lipossomas de sitio específicos são direcionados, pois possuem ligantes acoplados em sua superfície, os que atuam conferindo seletividade na distribuição do fármaco encapsulado no sitio de ação almejado. Os lipossomas de longa duração são revestidos superficialmente por polímeros hidrofílicos sintéticos ou naturais, especificamente os polietilenoglicóis (PEG) que previnem o reconhecimento e, conseqüentemente associação com as opsoninas no plasma, reduzindo a sua captura pelo sistema fagocitário mononuclear e o processo de reconhecimento molecular (LIRA *et al.*, 2009).

Os lipossomas são formados através da hidratação sob agitação de fosfolípidos (moléculas anfipáticas), gerando uma dupla camada de moléculas anfipáticas. A interação das regiões lipofílicas estabiliza o sistema, facilitando as interações com a fase aquosa (ALLEN; CULLIS, 2013). Constituindo sistemas altamente versáteis, que permitem alterações no volume, tamanho da superfície, e na composição lipídica e do meio aquoso interno (FRÉZARD *et al.*, 2005). São, portanto, capazes de transportar materiais ativos lipofílicos e aquosos.

Podem ser obtidos por diversos processos como agitação, sonicação, extrusão, liofilização, congelamento e descongelamento, evaporação em fase reversa, entre outros. A obtenção dos formatos vesiculares lipídicas com diâmetros variando entre 400 e 3500 nm estão relacionados ao modo de preparo. Os lipossomas de preparação mais imediata são as vesículas multilamelares (MLV), compostas por numerosas bicamadas lipídicas. Na figura 3 estão presentes os lipossomas do tipo MLV, LUV E SUV. A partir das vesículas multilamelares, são obtidas as demais vesículas unilamelares pequenas ou SUV (diâmetro: 45 a 80 nm); vesículas unilamelares grandes ou LUV (diâmetro superior a 100 nm); lipossomas multivesiculares ou MVL Figura 3 (FRÉZARD *et al.*, 2005).

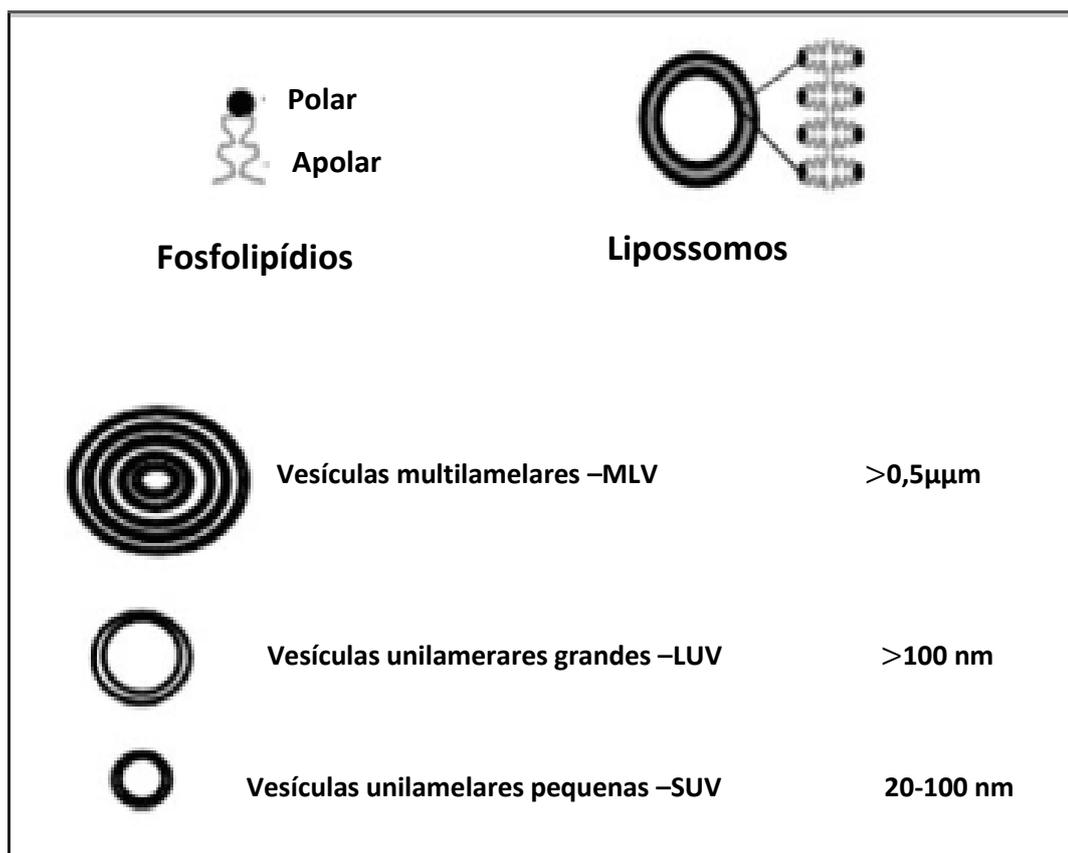


Figura 3 - Classificação dos lipossomos quanto ao tamanho e número de lamelas (Modificado de SHARMA; SHARMA,1997).

Na primeira fase de preparação dos lipossomos os componentes lipídicos são dissolvidos em solventes, a exemplo da acetona. Após a remoção do solvente a baixa temperatura e pressão, obtém-se um filme lipídico bem fino. Este filme é então hidratado com uma solução tampão, em temperatura superior a temperatura de transição de fase, de modo que ocorra a fusão do lipídio. Feito isto a solução é submetida a ciclos de agitação e aquecimento, após essa etapa obtém-se a suspensão de MLV e então os outros tipos de lipossomos. O SUV é preparado através do processo de sonificação, LUV através de extrusão, utilizando homogeneizadores de alta pressão, já o MVL é obtido através de congelamento e liofilização (FRÉZARD *et al.*,2005; PRISTA; ALVES; MORGADO, 1990).

As bicamadas dos lipossomos têm sido estudadas intensamente, pois suas propriedades são muito semelhantes àquelas das membranas naturais. Por exemplo, as bicamadas de fosfolípidios e as membranas naturais possuem alta resistência

elétrica; elas permitem que a água passe facilmente, mas não permitem a passagem de cátions ou ânions (RIDOUT; SANTUS; GUY, 1988).

As bicamadas são estruturas mais rígidas que as micelas, embora ambos sejam sistemas altamente dinâmicos, havendo constantes intercâmbios entre os monômeros fosfolipídios em solução e aqueles que fazem parte da estrutura. Esta rigidez pode ser avaliada pelo tempo de troca de monômeros entre os agregados e a solução, que é da ordem de mili segundos para micelas e várias horas para bicamadas de fosfolipídio (RIDOUT; SANTUS; GUY, 1988).

A partir dos resultados químicos, das evidências da microscopia eletrônica e da semelhança nas propriedades das membranas naturais com as bicamadas de fosfolipídios sintéticos, Singer e Nicholson (1972) postularam uma teoria unificadora da estrutura de membrana chamada de modelo do mosaico fluido. De acordo com o modelo de mosaico-fluido de Singer e Nicholson, a matriz da membrana biológica é uma bicamada de glicofosfolipídios na qual proteínas estão incorporadas em sua superfície ou em seu interior (SINGER; NICHOLSON, 1972).

Uma vantagem da aplicação de sistemas lipossomados, com relação a outros sistemas transportadores de ativos, é a sua elevada biocompatibilidade, especialmente quando estes são formados de lipídeos pertencentes às famílias de lipídeos naturais. Além disso, são sistemas altamente versáteis, podendo ser manipulados em função dos requisitos farmacêuticos e farmacológicos (FRÉZARD *et al.*, 2005). Os lipossomos possuem a capacidade de encapsular moléculas hidrofílicas no núcleo aquoso e moléculas hidrofóbicas na região apolar das bicamadas e liberar estas moléculas dentro de determinadas condições ambientais e energéticas (MALHEIROS; DAROIT; BRANDELLI, 2010). As presenças dessas características atribuem a utilização dos lipossomas a diferentes formas farmacêuticas com diferentes aplicações (LESOIN *et al* 2013).

A solubilização dos lipossomas através dos sais biliares caracteriza uma vantagem, ao almejar a incorporação de moléculas nesse sistema e com liberação no trato intestinal (RAMALDES *et al.*, 1996). As alterações do pH, ao longo do trato gastrointestinal, acarretam em alterações físicas e químicas na estrutura das vesículas, modificando a permeabilidade das membranas e, assim, contribuindo para a liberação do material encapsulado (NACKA *et al.*, 2001).

A encapsulação além de proteger o material encapsulado da umidade, luz, oxidação e de agentes externos adicionais, atua no controle da liberação das substâncias ativas. A liberação dos materiais encapsulados varia de acordo com a composição do agente encapsulante, mas normalmente ocorrem por: alteração de temperatura e de pH, solubilidade do meio, biodegradação, difusão, ruptura mecânica, permeabilidade seletiva, e gradiente de concentração existente em relação ao meio de liberação (BRANNON-PEPPAS, 1993).

Esses atributos fazem da encapsulação dos compostos bioativos dos extratos de uva *in natura* e residual em lipossoma algo promissor e desejável ao ponto de vista industrial. Uma vez que na indústria alimentícia e farmacêutica, os lipossomas são utilizados na encapsulação de enzimas, flavors, proteínas, vitaminas e antioxidantes (MOZAFARI *et al.*, 2008; TAYLOR *et al.*, 2005), e de antimicrobianos (MALHEIROS; DAROIT; BRANDELLI, 2010).

Diversas técnicas analíticas são empregadas para determinação do teor de bioativos e compostos fenólicos em uvas e seus derivados. Dentre elas destacam-se as técnicas cromatográficas e espectroscópicas, como a espectrofotometria de absorção no UV-VIS, ou a associação destas, como a cromatografia líquida acoplada à espectroscopia de massas (LC-MS) (SAUTTER *et al.*, 2005; PROESTOS *et al.*, 2005; BIRSE, 2007; JAITZ *et al.*, 2010).

A espectrofotometria é a técnica instrumental ou processo de medição baseado nas propriedades que os materiais têm em absorver ou emitir energia eletromagnética em determinada região do espectro eletromagnético, ou seja, que mede a radiação eletromagnética emitida ou absorvida por um corpo é designado espectrofotometria (MUSTRA, 2009). Os espectrofotômetros são instrumentos capazes de registrar dados referente as às propriedades de absorbância ou transmitância de um material em função do comprimento de onda. O espectro é o registro dos dados, sendo nominado espectro de absorção ou de transmissão, a depender do dado registrado, se for absorbância ou transmitância, respectivamente.

Cada espécie química apresenta um espectro de absorção característico permitindo a identificação das espécies químicas através da análise de seu espectro de absorção (VINADÉ; VINADÉ, 2005). Caldas *et al.*, (2015), utilizaram da espectrofotometria para medir a glicose, em 490 nm, pelo método convencional fenol-

sulfúrico (ESP-FS) na determinação dos teores de açúcares em suco concentrado e néctar de uva. Abe *et al.*, (2007), usaram o espectrofotômetro para determinar os compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. Vargas *et al.*, (2008), determinaram os polifenóis totais (método Folin-Ciocalteu), e a atividade antioxidante (método-DPPH) dos sucos de uva em espectrofotômetro de UV/VIS. Rockenbach *et al.*, (2008), avaliaram a Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades Tannat e Ancelota através da espectrofotometria.

2.6 Quimiometria

A Quimiometria envolve a aplicação de métodos matemáticos, estatísticos e computacionais para investigar, interpretar, classificar e fazer previsão de conjuntos de dados de interesse especialmente da Química, Engenharia Química, Engenharia de Alimentos e Biotecnologia.

No Brasil, os trabalhos em quimiometria podem ser agrupados em três áreas: planejamento e otimização de experimentos, reconhecimento de padrões (métodos de análise exploratória e classificação) e calibração multivariada (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2006). Durante a fase do planejamento do experimento são feitas as buscas pelas variáveis que mais afetam um determinado processo assim como suas interações. No reconhecimento de padrões, a partir de uma vasta gama de informações (medidas químicas ou espectrais, por exemplo) sobre uma série de objetos, pretende-se encontrar agrupamentos de amostras (objetos) que possuam similaridade, afim de detectar tendências nos dados. Na calibração multivariada, busca-se estabelecer um modelo que relacione uma série de medidas (químicas ou espectrais) realizadas em amostras com uma determinada propriedades a exemplo da composição (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2006).

A análise de dados representa um fator fundamental para o sucesso na obtenção de resultados em procedimento analítico. Dependendo da forma como é conduzida, pode ser do tipo univariada ou multivariada. Quando uma única variável é medida sistematicamente para várias amostras, é denominada de análise univariada de dados. A análise multivariada de dados químicos consiste na verificação da

relação entre grupos de variáveis dependentes coletadas sobre a mesma amostra e corresponde a um grande número de métodos e técnicas que utilizam, de forma simultânea, todas as variáveis para a interpretação teórica do conjunto de dados obtidos (MOURA *et al.*, 2006).

Diversos são os métodos de análise multivariada, os mais comumente utilizados são as de Análise de Componentes Principais (*Principal Component Analysis*, PCA) e Mínimos Quadrados Parciais (PLS) (MEIRA *et al.*, 2012). A PCA geralmente é empregada para visualizar a estrutura dos dados, encontrar similaridades entre amostras, detectar amostras anômalas (*outliers*) e reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados (WU; MASSART; DE JONG, 1997). A análise exploratória através da PCA é um dos métodos mais empregados em Quimiometria, tendo cada vez mais novos usuários do meio acadêmico (alunos de graduação, pós-graduação e pesquisadores) (SARKHOT; GRUNWALD; MORGAN, 2011).

A técnica de PCA possibilita uma visualização do conjunto de dados através de uma redução do número de variáveis a algumas poucas componentes principais, que são capazes de explicar em maior proporção o conjunto original, permitindo com isso, verificar como as amostras se relacionam entre si, ou seja, o quanto estas se assemelham segundo as variáveis utilizadas no trabalho (MEIRA *et al.*, 2012). É uma técnica matemática de análise multivariada que possibilita a realização de pesquisas com elevados números de dados coletados, tornando possível a identificação de medidas responsáveis pelas maiores variações entre os resultados, sem ocasionar perdas significativas de informações.

A PCA é um método que permite a redução da dimensionalidade através da representação do conjunto de dados em um novo sistema de eixos, denominados componentes principais (CP), permitindo a visualização da natureza multivariada dos dados em poucas dimensões (WOLD; ESBENSEN; GELADI, 1987). No espaço original, as amostras são pontos localizados em um espaço n-dimensional, n equivale ao número de variáveis. Com a redução de dimensionalidade proporcionada pela PCA, as amostras passam a ser pontos localizados em espaços de dimensões reduzidas definidos pelas PCs, por exemplo, bi- ou tridimensionais. Matematicamente, na PCA, a matriz **X** é decomposta em um produto de duas matrizes, denominadas escores (**T**) e pesos (**P**), mais uma matriz de erros (**E**) (WOLD *et al.*, 1987) como mostrado na

Equação 1:
$$X = TP^t + E \quad (1)$$

As CP são obtidas pela transformação de um conjunto de variáveis aleatórias correlacionadas em um conjunto de variáveis não correlacionadas e ortogonais entre si. Essas variáveis são combinações lineares das variáveis originais nas quais a primeira componente principal fornece a maior variância dos dados originais. A segunda variável é responsável pela maior variância restante, sem haver correlação com a primeira, e assim por diante. As componentes principais podem ser descritas como uma combinação linear das variáveis originais, denominadas por meio dos autovalores (λ) e dos autovetores (ℓ). Os autovalores de uma matriz de correlação correspondem à variância de cada componente principal, sendo a base para a construção das cargas fatoriais (VICINI, 2005).

Na análise de componentes principais, o agrupamento dos indivíduos é de acordo com *as suas* correlações, ou seja, estão agrupados de acordo com a suas variâncias ou seu comportamento dentro da população, que pode ser identificado pela variação do conjunto de características capazes de definir, o indivíduo. Ou seja, os indivíduos são agrupados segundo suas variâncias (KHATTREE; NAIK, 2000).

A determinação dos componentes principais é obtida através dos cálculos iniciais da matriz de variância-covariância (Σ) ou de correlação (R), encontrar os autovalores e os autovetores. Os autovetores representam a variabilidade de cada componente, a soma dos mesmos equivale ao número de variáveis. Caso as componentes sejam removidas da matriz de correlação, a somatória dos componentes explicará 100% dos dados, sem perda de informação. A figura 4 descreve um esquema para a determinação dos componentes principais.

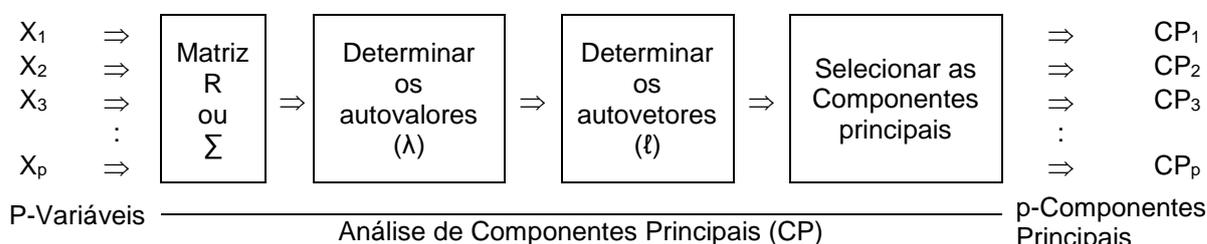


Figura 4 - Esquema para encontrar as raízes características que formarão os autovetores. Fonte: SOUZA, 2000.

Várias ferramentas são utilizadas para a escolha do número de componentes principais. Uma das ferramentas utilizadas nessa escolha é o gráfico *scree plot*

proposto por Cattle (1966), que consiste de um gráfico dos autovalores distribuídos em função da ordem das componentes principais. Este gráfico representa o percentual de variância explicada por componente. À medida que a porcentagem se reduz e a curva se torna quase paralela ao eixo das abscissas, podem-se excluir os componentes correspondentes (Figura 5).

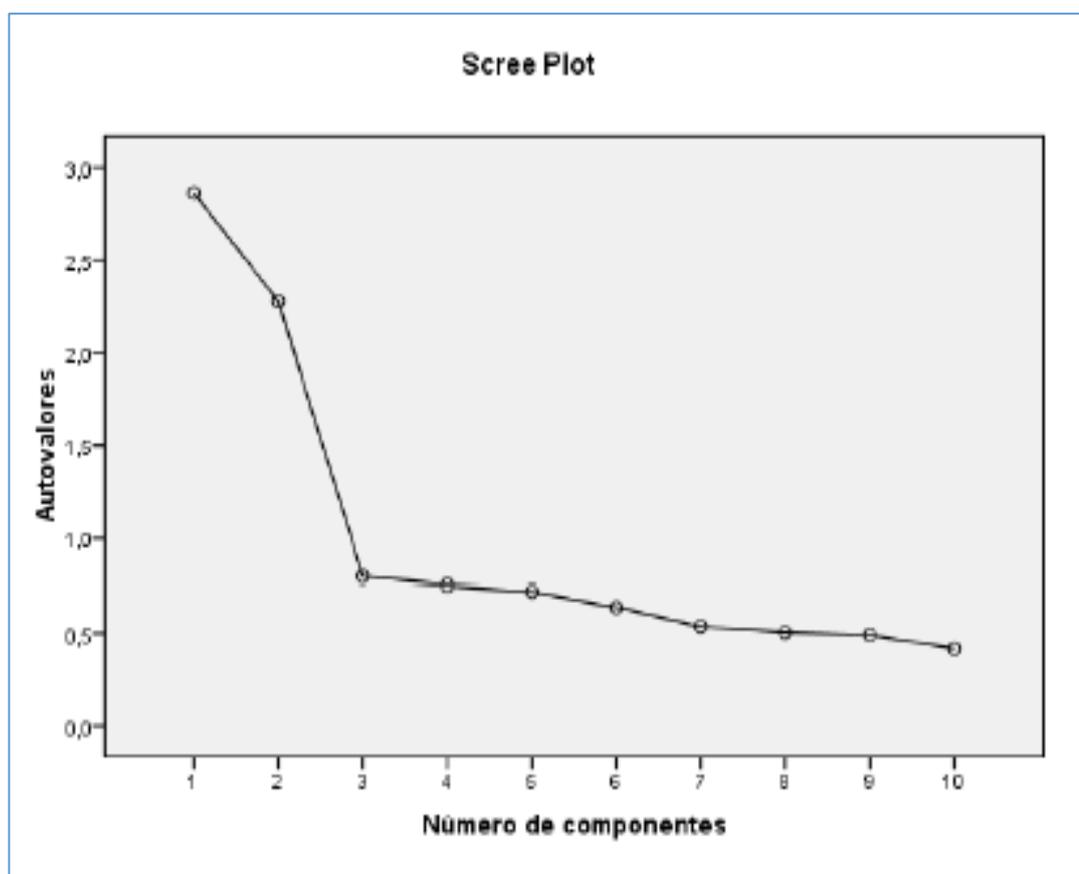


Figura 5 - Gráfico scree plot (cotovelo) para uma análise de componentes principais. Fonte: ROSENBERG, 1965.

Este gráfico esboça de que maneira a variabilidade dos dados está distribuída nos eixos da ordenação. Permitindo a identificação do número de eixos mais significativos. O número das componentes principais a serem utilizados também pode ser determinado através da inclusão de componentes cujos autovalores (*eigenvalue*) são superiores a um. Este critério foi sugerido por Kaiser (1958). Assim a Análise de Componentes Principais (*Principal Component Analysis, PCA*) é um método exploratório capaz de separar informações importantes das incertas, desnecessárias

e repetidas. Auxiliando na elaboração de hipóteses gerais a partir da coleta de dados (PANERO; DA SILVA, 2008).

A análise de componentes principais (PCA) consiste basicamente em reescrever as coordenadas das amostras em outro sistema de eixo mais conveniente para a análise dos dados. As n-variáveis originais geram, através de suas combinações lineares, n-componentes principais, cuja principal característica, além da ortogonalidade, é que são obtidos em ordem decrescente de máxima variância, ou seja, a componente principal 1 detém mais informação estatística que a componente principal 2, que por sua vez tem mais informação estatística que a componente principal 3 e assim conseqüentemente (KOWALSKI,1984).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo do trabalho é microencapsular por extrusão os extratos obtidos de uva *in natura* e do resíduo industrial, a fim de avaliar e comparar as propriedades físico-químicas, composição de compostos fenólicos e atividades antioxidantes das amostras estudadas, visando o aproveitamento e aplicabilidade desses resíduos como fonte de compostos de interesse para as indústrias de alimentos, cosméticos e fitoterápicos.

3.2 Objetivos específicos

1. Microencapsular os extratos de uva *in natura* e residual por sistemas lipossomais;
2. Determinar a atividade antioxidante dos extratos e dos sistemas lipossomados;
3. Avaliar as propriedades físicas, físico-químicas dos extratos e dos sistemas lipossomados;
4. Analisar as características organolépticas;
5. Determinar o teor de compostos fenólicos dos extratos puros e dos lipossomados;
6. Realizar PCA com as matrizes de dados obtidos na técnica espectroscópica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Equipamentos

Placa de aquecimento e agitador magnético modelo (78HW-1) da BIOMIXER®; As pesagens foram feitas em balança analítica (AND®, modelo HR 200); As amostras foram trituradas no liquidificador industrial (Vitalex-LQI-04); O rota evaporador utilizado na retirada dos solventes foi o (QUIMIS- Q344M2) com temperatura em geral entre 35°C e 50°C; As amostras foram armazenadas na estufa (Fabbe, Graduação 0 a 100°C) e no refrigerador (Ecoplus 370-Bosch); A água ultrapura utilizada foi obtida em um sistema NANOpure Diamond™ (Barnstead®, Dubuque, Iowa, EUA); e visualizadas em Microscópio óptico Olympus BX-43 e fotografados com câmera Samsung Galaxy 2 16.3MP. As leituras das absorvâncias na PCA e determinação de fenólicos e flavonóides foram realizadas em espectrofotômetro Varian®, modelo Cary 50; As leituras das absorvâncias do teste de atividade foram executadas em um leitor de ELISA (Biotek®), modelo EL800. O potencial hidrogeniônico foi obtido pHmetro Micronal – Mod. B-474

4.1.2 Reagentes e solventes utilizados

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

- ✓ DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) SIGMA-ALDRICH®
- ✓ Ácido ascórbico; Merck®;
- ✓ Palmitato de isopropila- Merck®;
- ✓ BHT (butil hidroxitolueno) –Merck®;
- ✓ Polaxamer 407-Sigma®;
- ✓ Sortbato de potássio –Merck®;
- ✓ Carbonato de sódio- Sigma®;
- ✓ Cloreto de alumínio –Sigma®;
- ✓ Nitrito de sódio –Sigma®;
- ✓ Hidróxido de sódio—Sigma®;
- ✓ Folin-Ciocalteu. –Sigma®;
- ✓ Álcool etílico 95%- LabSynth®;
- ✓ Álcool metílico P.A –Vetec®.

4.1.3 Substâncias químicas de referência padrão

- ✓ Quercetina padrão de primário de referência, teor de pureza 100%, Sigma ®;
- ✓ Ácido gálico padrão primário de referência, teor de pureza 99,95%, Sigma ®.

4.2 Amostras

As uvas da variedade Aragonez pertencentes à família da *Vitis vinifera* e os resíduos de uvas em estudo foram gentilmente cedidos pela vinícola Miolo e Santa Maria localizadas no Vale de São Francisco do Estado da Bahia, recepcionadas dia 03/09/2014, no Laboratório de Farmacotécnica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia (UFBA) em Salvador -Ba onde foram higienizados com água e álcool etílico 70° e armazenados em freezer (-20°C) até início das análises.

4.3 Obtenção dos extratos

4.3.1 Extrato de uva *in natura*

Para a obtenção do extrato foi utilizado como líquido extrator o álcool etílico P.A. As uvas (400 g) foram trituradas no liquidificador industrial (Vitalex LQI-04) (Figura 6) juntamente com 400 mL do líquido extrator e em seguida acondicionados no percolador. O sistema de percolação foi constituído por uma camada de algodão, papel filtro, o material a ser percolado e, por último, outro papel filtro, logo após foi adicionado o solvente sobre papel filtro. Inicialmente as uvas permaneceram em contato constante com o líquido extrator durante um período determinado de dez dias. Durante esse período foi necessária a adição de uma quantidade de 1,200 mL de álcool etílico para manter o nível inicial.

Ao findar esse período, deu-se o início do processo de percolação propriamente dito com a abertura da torneira do aparelho. O controle do gotejamento foi estabelecido a uma velocidade de 5mL/mim⁻¹, e mantido até o total esgotamento do solvente, que foi observado através da coloração incolor, característico do líquido extrator. A temperatura de extração esteve entre 25-30 °C.

A solução resultante (1600mL), foi concentrada em evaporador rotativo (Q344M2- QUIMIS), sob pressão reduzida, à temperatura de banho-maria de 40-50 °C, com a finalidade de retirada do solvente. Para finalizar a retirada do resíduo de solvente o material foi mantido em capela com fluxo laminar para evaporação final. O material foi mantido sobre refrigeração a 4°C e protegido da luz para posterior utilização.



Figura 6 - Liquidificador industrial (Vitalix LQI-04) B-Percolador

4.3.2 Extratos de resíduo de uva

O resíduo da uva é composto por casca, engaço, sementes e polpa desidratada. Para a elaboração do extrato houve a necessidade da retirada manual das sementes do resíduo, com o intuito de evitar interferências. Após esse procedimento o resíduo foi então triturado no liquidificador industrial (vitalix-LQI-04) as partículas foram padronizadas através da tamisação (Tamis nº 10), obtendo o padrão de pó grosso (Farmacopéia Brasileira, 2010). A massa foi umedecida em álcool etílico (400 mL), e acondicionado no percolador. O equipamento foi previamente preparado colocando-se sequencialmente uma camada de algodão, papel filtro, a amostra e por último outro papel filtro, logo após foi adicionado o líquido extrator lentamente pelas paredes do recipiente. Durante o período de dez dias da procedeu-se a maceração com a adição de alíquotas do líquido extrator.

No decimo dia 10 iniciou-se a percolação com o gotejamento da solução com velocidade controlada de 5mL/mim⁻¹, mantido até o total esgotamento do solvente,

que foi observado através da coloração incolor, característico do líquido extrator. A temperatura de extração esteve entre 25-30 °C.

A solução resultante 1600 mL foi concentrada em evaporador rotativo (Q344M2- QUIMIS), sob pressão reduzida, à temperatura de banho-maria de 40-50 °C, com a finalidade de retirada do solvente. Para finalizar a retirada do resíduo de solvente o material foi mantido em capela com fluxo laminar para esgotando final do solvente. A massa resultante foi mantida sobre refrigeração a 4°C e protegida da luz para posterior utilização.



Figura 7 - Fluxograma de obtenção do extrato de uva residual

4.4 Obtenção do sistema de lipossomas

4.4.1 Sistema de extrusão-lipossoma de uva in natura a 5%

O sistema de extrusão utilizado na obtenção do lipossoma foi constituído através de duas fases: oleosa e aquosa.

Para a obtenção de 50 gramas de lipossomas a 5%, foram utilizados 27 gramas da fase aquosa (composta por 10g de hidrogel de polaxamer 407, 0,1g de sorbato de potássio e quantidade suficiente de água destilada para 50mL), e 23 gramas da fase oleosa, obtida através da incorporação de 2,5 gramas do extrato de uva *in natura* a 20,5g da fase oleosa (constituída de lecitina de soja granulada, palmitato de Isopropila e ácido sórbico nas quantidades de 25g, 25g e 0,5g) (WILLIMANN *et al*, 1992 - ADAPTADO).

Uma alíquota de 5,4 gramas da fase aquosa foi transferida para uma seringa tipo *luer lock* (10mL) e 4,6 g da fase oleosa foi acondicionada em outra seringa com as mesmas especificações (figura 8-A). As seringas foram acopladas com auxílio de um conector formando um ângulo de 90 graus figuras (B e C). Foi aplicada uma pressão, em cada embolo por vez de maneira alternada para a incorporação das fases (figura D). Esse procedimento foi reproduzido 110 vezes, até total homogeneização. Esse processo foi continuamente repetido por 5 vezes. O sistema

obtido foi devidamente armazenado e mantido sob-refrigeração (10 °C) (JONES, 2003 – ADAPTADO).

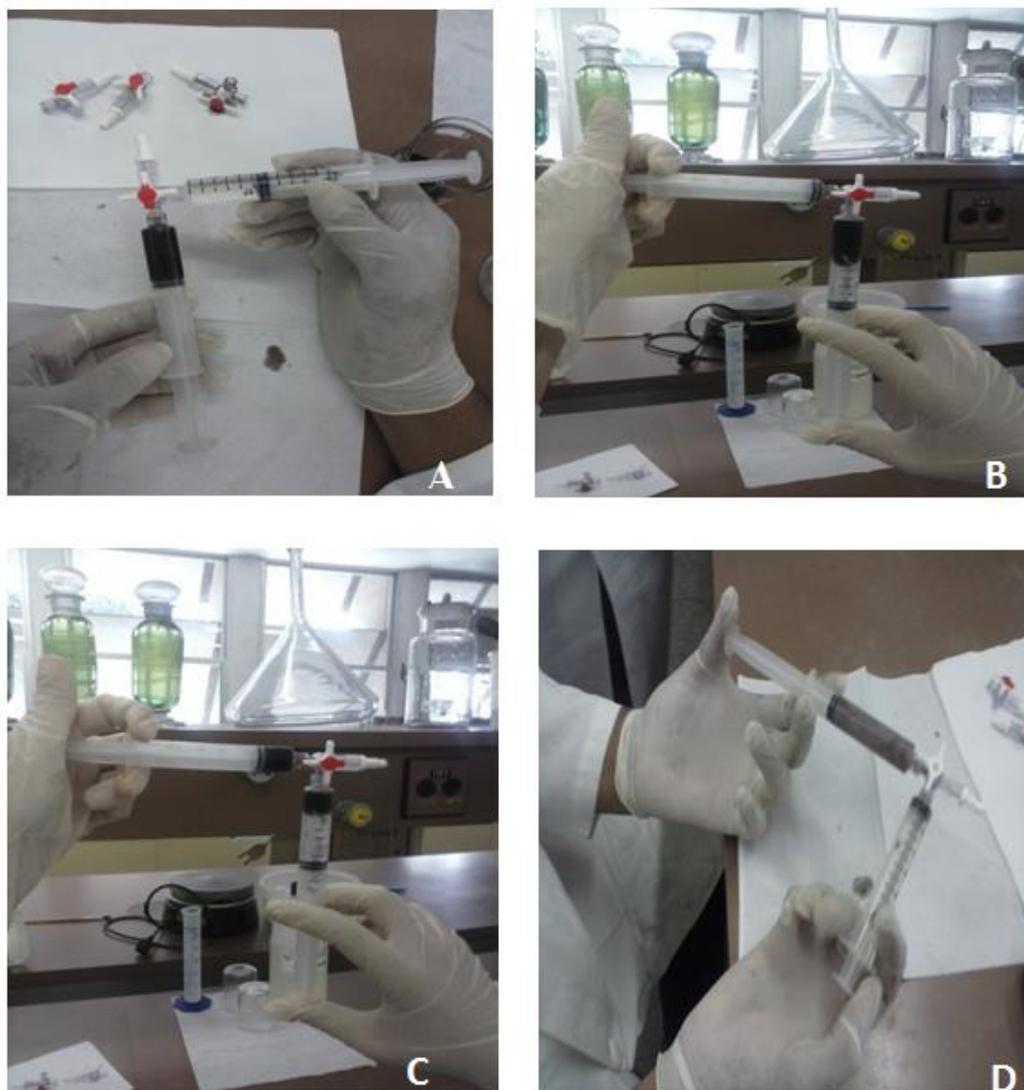


Figura 8 - Fase A; Fase B; Fase C, e Fase D- Sistema de extrusão

4.4.2 Sistema de extrusão-lipossomas do resíduo da uva

Para obtenção do lipossoma residual foi aplicada a metodologia descrita no item 4.4.1 Todas as concentrações foram mantidas, porém o extrato utilizado foi o de uva residual.

4.5 Avaliação dos extratos e dos sistemas nanoencapsulados da uva *in natura* e do resíduo

4.5.1 Microscopia óptica

As amostras foram preparadas a temperatura ambiente e filtrados a 0,45 μm , uma pequena alíquota de cada amostra concentrada foi depositada sobre uma lâmina de vidro apropriada de 10x3 cm, uma porção considerável de água MilliQ foi adicionada para dispersão da amostra e uma outra lâmina foi sobreposta. Analisados em Microscópio óptico Olympus BX-43 e fotografados com câmera Samsung Galaxy 2 16.3MP.

4.6 Avaliação da estabilidade física

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). Este estudo contribui para a orientação no aperfeiçoamento das formulações, do material adequado de acondicionamento, na estimativa do prazo de validade e informações sobre confiabilidade e segurança dos produtos.

4.6.1 Ensaio de estabilidade - teste de prateleira

O teste de prateleira, também conhecida como shelf life, objetiva o fornecimento de dados preditivos do tempo de vida útil e a compatibilidade da

formulação com o material de acondicionamento. É empregado em escala laboratorial e piloto de fabricação. Possui duração de 90 dias, podendo se estender por seis meses a um ano. De um modo geral, avalia-se características organolépticas, físico-químicas e microbiológicas.

As amostras obtidas foram armazenadas em recipientes de vidro transparente com tampa, devidamente identificados. Após o preparo das amostras ocorreu o início dos testes de estabilidade de acordo com o Guia de estabilidade de produtos cosméticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2004). Todos os testes foram realizados em triplicata. As amostras foram submetidas a diferentes ambientes: temperatura ambiente $25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, estufa (Fabbe, Graduação 0 a 100°C) a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, e no refrigerador (Ecoplus 370-Bosch) a $-5 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Tabela 1 - Amostras avaliadas

Amostra 1	LIP	Sistema lipossomado puro
Amostra 2	LUN	Sistema lipossomado contendo extrato da uva <i>in natura</i>
Amostra 3	LUR	Sistema lipossomado contendo extrato de uva residual
Amostra 4	EUN	Extrato da uva <i>in natura</i>
Amostra 5	EUR	Extrato de uva residual

4.6.2. Características Organolépticas

As amostras foram avaliadas de acordo com os parâmetros organolépticos e físico-químicos, em periodicidade de zero, 24 horas e 7, 15, 30, 60 e 90 dias em diferentes ambientes, a temperatura ambiente $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ em estufa a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e no freezer a $-5 \pm 2^{\circ}\text{C}$. A análise organoléptica foi efetuada através da percepção de alterações olfativa e visuais nas amostras durante o 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, acre, suave e suas alterações: Alterado (A), levemente alterado (L.A.) e sem alteração (S.A.).

4.6.3 Avaliação do pH

O potencial hidrogeniônico foi avaliado em pHmetro Micronal – Mod. B-474 equipado com eletrodo de ponte simples. Previamente calibrado em soluções tampão pH 4,0, 7,0 e 9,0 (Merck) antes de efetuar as leituras nas amostras obtidas dos extratos e dos sistemas lipossomados. As amostras tiveram seu pH avaliados em periodicidade de zero, 24 horas e 7, 15, 30, 60 e 90 dias em diferentes ambientes, a temperatura ambiente $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ em estufa a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e no freezer a $-5 \pm 2^{\circ}\text{C}$. O pH é um dos responsáveis pelas características organolépticas dos vinhos e sucos de uva (SACH, 2001).

4.7 Avaliação da capacidade antioxidante dos extratos e dos lipossomas.

Para avaliar o potencial antioxidante do extrato de uva *in natura*, do resíduo e dos lipossomas foi utilizado o método de sequestro de radicais livres por DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) (RUFINO *et al.*, 2007). Essa metodologia tem como base o fato do DPPH (Figura 9) ser um radical livre estável de coloração violeta, que aceita um elétron ou um radical hidrogênio para tornar-se uma molécula neutra, sendo reduzido na presença de um antioxidante e adquirindo coloração amarela (MENSOR *et al.*, 2001).

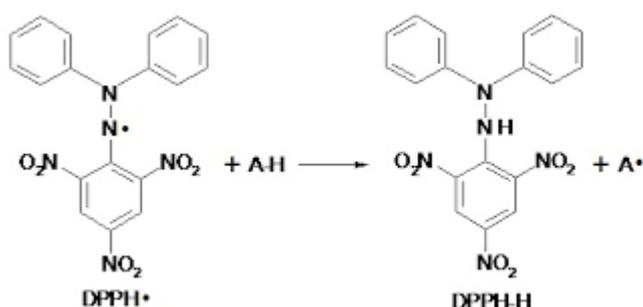


Figura 9 - Reação genérica entre o radical livre DPPH e um antioxidante

A reação foi monitorada em espectrofotômetro de microplaca (Biotek) com incubação a 25°C . A leitura foi efetuada em comprimento de onda $\lambda = 517 \text{ nm}$. O branco foi preparado substituindo o volume dos extratos e dos lipossomas por igual volume solução de DPPH. O padrão utilizado foi o butil hidroxitolueno. (BHT).

As diluições em metanol de 1,0, 5,0 e 2,5% dos diferentes extratos e dos sistemas lipossomados foram efetivadas em balões de 25 mL. Todas as determinações foram realizadas em triplicata. A atividade antioxidante foi determinada em microdiluição, adicionando-se em cada cavidade da microplaca 250 µL da solução de DPPH (40 mg/mL) e 50 µL de etanol para o controle, o mesmo volume para as soluções padrões (BHT) e as amostras a serem testadas nas concentrações de 10, 5,0, 2,5 mg/mL. As leituras das absorbâncias foram realizadas no tempo 0 e 00:15 min em espectrofotômetro. As análises permaneceram em repouso a temperatura ambiente (23,0 ±2 °C) ao abrigo da luz por um período de 15 minutos.

O decaimento da absorbância das amostras (A_{am}) correlacionado ao decaimento da absorbância da amostra controle (A_c) resultou na porcentagem de sequestro de radicais livres (% SRL), que pode ser expressa através da seguinte equação:

$$\% \text{ SRL} = \frac{A_c - A_{am}}{A_c} \times 100$$

Onde Abs: absorbância lida em 517 nm após o tempo (0 e 15 min) de reação.

A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante, sendo que a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% é denominada concentração inibitória (CI50), também chamada de concentração eficiente (CE50). Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua CI50 e maior a sua atividade antioxidante (YEN; WU, 1999). Para o cálculo do IC50 foi utilizada a equação da reta, substituindo o valor de y por 50 para obtenção da concentração da amostra com capacidade de reduzir 50% do DPPH.

4.8 Avaliação do conteúdo fenólicos totais

O conteúdo de polifenóis totais foi determinado pelo método espectrofotométrico desenvolvido por Folin-Ciocalteu (ROSSI; SINGLETON, 1965). Shirahigue (2008), cita o metanol como melhor solvente para extração de compostos

fenólicos devido a sua polaridade, mas não aconselha sua aplicação em extratos que serão aplicados em alimentos devido a sua toxicidade. Em um tubo de ensaio foi adicionado 100µL de cada uma das amostras (extratos e lipossomas na concentração de 6 mg/mL diluídos em metanol P.A). Em seguida adicionou-se 60µL de H₂O destilada e 500µL de reativo Folin-Ciocalteu. Após homogeneizar em vórtex adicionou-se 2mL de carbonato de sódio a 15,0%. Após 2 horas mediu-se a absorbância em 750 nm em espectrofotômetro (Varian Cary 50 UV/Vis) com cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm (Beckman Coulter). A quantificação de fenólicos totais foi realizada através de curva de calibração de ácido gálico (263nm). 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 absorbância da amostra.

4.9 Determinação dos flavonóides totais.

A determinação de flavonóides foi de acordo com a metodologia descrita por Fu *et al.*, (2010) com adaptações. A técnica baseia-se na medida da absorbância, a 425 nm, do complexo formado entre o flavonoide e o alumínio do reagente de cor, formando compostos de coloração amarelada. Os resultados foram expressos como equivalentes de catequina (ECAT) 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, 0,5mL da amostra 100 mg/mL de nitrito de sódio 5%, após 6 minutos adicionou-se 100 mg/mL do cloreto de alumínio a 10%, após 5 minutos adicionaram-se 1mL de hidróxido de sódio 1M. Completou-se o volume do balão com água destilada e homogeneizou-se manualmente. Após 30 minutos a absorbância foi medida em espectrofotômetro (Varian Cary 50 UV/Vis) com cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm (Beckman Coulter) a 425 nm, 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 2, 4, 6, 8,10,12,14,16,18,20 mg/mL.

O resultado do teor de flavonóides totais foi expresso como equivalente de quercetina (mg QUE/g), 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 absorbância.

4.10 Análise do componente principal -PCA

4.10.1 Preparo da solução padrão intermediária de ácido gálico

Foi transferida para um balão volumétrico de 100,0 mL um volume de 5,0 mL da solução estoque de ácido gálico ($100,0 \text{ mg/L}^{-1}$). Em seguida o volume do balão foi completado com etanol até obter uma solução intermediária contendo ácido gálico na concentração de $5,0 \text{ mg/L}^{-1}$.

4.10.2 Preparo das amostras para a PCA

Para cada amostra de extrato de uva (*in natura* e residual) e lipossoma de uva (*in natura* e residual) foram realizadas diluições em balão volumétrico com etanol, conforme Tabela 2.

Tabela 2 - Composição volumétrica das soluções obtidas com as amostras dos extratos e aditivadas com os padrões de ácido gálico para a PCA.

Balão	Solução das amostras (mL)	Volume da solução padrão de ácido gálico (mg/L)	Volume final (mL)	Concentração final do padrão de ácido gálico (mg/L)
1	1,0	-	10,0	-
2	1,0	5,0	10,0	0,5

4.10.3 Espectroscopia UV-VIS e PCA

Na análise espectrofotometria no UV-VIS foram analisadas as amostras descritas na Tabela 2.

As amostras foram analisadas em triplicata no espectrofotômetro Marca Varian, Modelo Cary 50, à temperatura ambiente. Esse espectrofotômetro opera na faixa espectral de 200 a 800 nm. Foram utilizadas cubetas de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm e capacidade de 1 mL.

Os espectros foram salvos no formato *Comma Delimited* (CSV) e exportados para o software OriginPro® 8. Para fazer a PCA com as amostras, os dados espectrais foram organizados em uma matriz bidimensional (2D) com dimensões de 8 (média das leituras das triplicatas das amostras) x 121 (comprimentos de onda de absorção). A matriz 2D foi centrada na média e submetida à análise covariante. A fim de se verificar se existiam similaridades entre as amostras e os componentes listados na Tabela 2, uma matriz de dados foi confeccionada para a análise de PCA.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Microscopia óptica

A microscopia óptica foi empregada para uma avaliação microscópica das vesículas estudadas através de um microscópio óptico convencional. Numa análise preliminar de lipossomas foi utilizado um Olympus BX-43 sob luz normal, para observação direta, e sob luz polarizada. O microscópio dispõe de objetivas de 10X e 40X. As imagens foram registradas através de uma câmera fotográfica Samsung Galaxy 2 16.3MP.

Foi observada a formação de vesículas de forma circular com superfície topográfica acentuada (Figura 9).

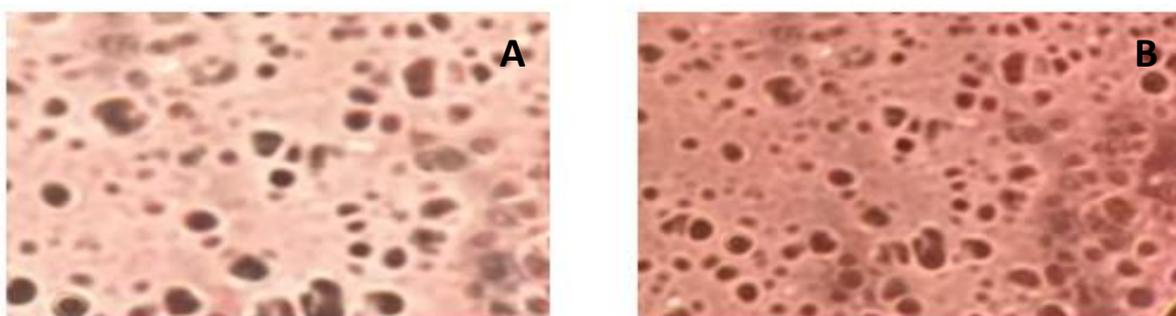


Figura 10 - Fotomicrografia dos Lipossomas contendo uva *in natura* (A) e resíduo de uva (B) em um aumento de 40 vezes.

As vesículas observadas através da imagem possuem diâmetro homogêneos. Estes lipossomas após serem depositados sobre a placa apresentaram uma morfologia tipo esferas, aparentemente, estruturas achatadas, com presença de um volume no seu interior, observando também a ocorrência de bicamadas e/ou monocamadas lipídicas.

O tamanho das vesículas bem como a sua distribuição em cada preparação é de grande relevância, pois afetam diretamente a biodistribuição e o tempo de circulação dos lipossomas, assim como seu processo de captura pelas células do sistema mononuclear fagocitário (SMF). A velocidade de liberação do princípio ativo pode ser controlada pela manipulação tanto da composição da membrana (influenciando a velocidade de degradação dos lipossomas) quanto do tamanho dos lipossomas. Assim, lipossomas pequenos são capturados com menor eficiência que

lipossomas grandes e apresentam uma liberação mais prolongada (FRÉZARD *et al.*, 2005).

5.2 Avaliação do potencial Hidrogênico (pH)

A determinação do pH de uma formulação para aplicação tópica é de suma importância uma vez que o pH afeta a penetração cutânea dos fármacos, cada produto deve apresentar pH compatível com a região do corpo onde se aplica.

Normalmente 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, 2009).

Os pH do lipossoma de uva residual e do lipossoma da uva *in natura* apresentados nas Tabelas (3, 4 e 5) não foram significativamente alterado em função do tempo e da temperatura). O que parece indicar que apesar das formulações terem oxidado com o passar do tempo, o seu pH permaneceu estável com valores próximos do 5,5, encontrado na pele. Assim, é permitido concluir que há ausência, ou pouca, interferência na fisiologia normal da pele, preservando o filme hidrolipídico e ajudando na penetração cutânea do sistema de liberação lipossomados de uva residual e do lipossoma da uva *in natura*.

As alterações dos valores do potencial de hidrogênio nos extratos e nos sistemas lipossomados podem ter sido causadas pela sensibilidade a fotodegradação das substâncias presentes nos extratos, ocasionando a absorção de uma porção do espectro violeta. A absorção dessa radiação altamente energética ativa elétrons que se tornam muito reativos e promovem a oxidação, clivagem ou outro tipo de degradação (SHAH *et al.*, 2008). Nesse estudo a média de pH 3,8 do extrato da uva Aragonez foi semelhante ao encontrado por Tomaz (2013), que realizou um estudo comparativo entre diversas cultivares de uva. Concluindo que a diferença significativa destes parâmetros pode ser ocasionada por diferentes fatores como clima e cultivares de uva.

A média de pH 3,40 do extrato de uva residual apresentada no nosso estudo é próxima ao pH recomendado na fabricação de vinho. Esse parâmetro é um dos responsáveis pelas características organolépticas e pela coloração dos vinhos e

sucos. No processo de produção de vinho tinto, o ideal é que o pH do mosto seja inferior aos 3,30 (RIZZON; GATTO, 1987). Entre os fatores que interferem no equilíbrio ácido-base ocasionando alterações do pH estão a dissolução dos minerais e ácidos orgânicos da película e da polpa da uva durante o contato da casca com o mosto, a degradação do ácido málico em ácido láctico durante a fermentação maloláctica, a precipitação do ácido tartárico na forma de bitartarato de potássio e tartarato neutro de cálcio, e a síntese de ácidos orgânicos durante a fermentação alcoólica (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006). Valores superiores podem ser causados pela elevada absorção de potássio (K) pela videira o que ocasiona salificação dos ácidos orgânicos, especialmente o ácido tartárico. A acidez do mosto e do vinho pode ser avaliada por meio da acidez titulável, da concentração dos ácidos orgânicos e da acidez real (expressa pelo pH) (RIZZON; MIELE, 2002).

Outro fator a ser considerado é a falta de informação sobre o processo que deu origem ao resíduo da uva, assim pode se inferir que uma possível explicação para o resultado do pH do extrato de uva residual é decorrente da composição química do bagaço de uva, relacionada com a intensidade da prensagem sofrida no processo industrial.

Tabela 3 - valores de pH em diferentes períodos a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$

AMOSTRAS À TEMP. AMBIENTE (25°C)	0h	24 horas	07 dias	15 dias	30 dias	60 dias	90 dias
Lipossoma puro	5,55	5,64	5,48	5,67	5,53	5,47	5,52
LUN -Lipossoma de uva <i>in natura</i>	5,51	5,62	5,53	5,57	5,59	5,50	5,56
LUR-Lipossoma de uva residual	4,80	4,78	4,80	4,87	4,9	4,91	4,95
EUN-Extrato da uva <i>in natura</i>	3,93	3,85	3,83	3,92	3,85	3,85	3,91
EUR-Extrato da uva residual	3,40	3,47	3,51	3,50	3,53	3,50	3,54

Tabela 4 - valores de pH em diferentes períodos a $-5 \pm 2^{\circ}\text{C}$

AMOSTRAS DO FREEZER (-5°C)	0h	24 horas	07 dias	15 dias	30 dias	60 dias	90 dias
Lipossoma puro	5,55	5,57	5,62	5,81	4,77	5,43	5,45
LUN -Lipossoma de uva <i>in natura</i>	5,51	5,15	5,68	5,22	5,58	5,2	5,65
LUR-Lipossoma de uva residual	4,80	4,97	4,94	4,92	4,94	4,90	4,93
EUN-Extrato da uva <i>in natura</i>	3,93	3,93	3,94	3,85	3,86	3,88	3,91
EUR-Extrato da uva residual	3,40	3,47	3,43	3,45	3,43	3,40	3,37

Tabela 5 - valores de pH em diferentes períodos a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$

AMOSTRAS DA ESTUFA (35°C):	0h	24 horas	07 dias	15 dias	30 dias	60 dias	90 dias
Lipossoma puro	5,55	5,51	5,58	5,55	5,13	5,29	5,38
LUN -Lipossoma de uva <i>in natura</i>	5,51	5,58	5,74	5,61	5,53	5,4	5,43
LUR-Lipossoma de uva residual	4,80	4,80	4,82	4,87	4,90	4,92	4,95
EUN-Extrato da uva <i>in natura</i>	3,93	4,3	4,07	3,64	3,92	4,17	3,58
EUR-Extrato da uva residual	3,40	3,40	3,37	3,35	3,32	3,30	3,30

5.3 Ensaio da estabilidade física

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).

As amostras foram avaliadas durante 90 dias e armazenadas em três condições ambientais distintas: à temperatura ambiente (25°C), sob refrigeração (-5°C) e na estufa (35°C). A cor determinada como padrão foi o bege, que é uma cor secundária, o aspecto foi classificado como homogêneo ou não homogêneo, o odor padrão foi o flavor da própria fruta (uva).

As amostras do lipossoma puro (padrão) e de uva *in natura* mantidas a temperatura ambiente $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ demonstraram leves alterações na coloração no sexagésimo dia, essa alteração também foram observadas nos lipossomas de uva residual nonagésimo dia. As demais amostras mantiveram seus padrões inalterados durante os noventa dias (Tabela 6). As formulações nanoencapsuladas submetidas à temperatura ambiente apresentaram-se estáveis não havendo uma diferenciação notória em sua coloração ou em seu odor. Gabriels e Plaizier-Vercammen (2003) não observaram degradação química em lipossomas constituídos por fosfatidilcolina de soja após 6 meses a 22°C , ao abrigo do oxigênio e da luz, resultados semelhantes foram obtidos por Terra e colaboradores (2009) que avaliaram por 4 semanas formulações de lipossomas contendo sinefrina e cafeína.

Os estudos de estabilidade realizados por Gabriels e Plaizier-Vercammen (2003) afirmam que os lipossomas constituem sistema inerentemente estável, desde que não submetidos a condições extremas. Ao avaliar as amostras refrigeradas, foi

observado que apenas o lipossoma puro sofreu alterações da cor no 7º dia e do aspecto no 60º dia (Tabela 8).

As amostras mantidas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ não demonstraram alterações no aspecto (Tabela 8), contudo as constituídas de sistemas lipossomados apresentaram alterações da cor e no odor. Nessa condição o sistema lipossomado puro apresentou uma leve alteração da cor no 7º dia, o lipossoma *in natura* e o lipossoma de uva residual alteraram levemente sua coloração no 15º dia, no nonagésimo dia todas essas amostras estavam com a cor e o odor alterados.

A oxidação dos sistemas lipossomados foi observada através da intensificação da coloração das amostras na temperatura de 35°C , esses resultados foram compatíveis com os obtidos por Terra e colaboradores (2009) que observaram oxidação da formulação de lipossomas contendo sinefrina e cafeína na temperatura de 40°C . Em temperaturas elevadas, há certa separação das fases da formulação, que são normalizadas com o retorno da formulação à temperatura ambiente. Altas temperaturas aceleram reações de oxidação e hidrólise, ocasionando alterações em: atividade de componentes, viscosidade, aspecto, cor e odor do produto (BRASIL, 2004).

As alterações da cor e odor apresentados pelas amostras resultam de fatores ambientais como luz, calor, umidade e atividade biológica de enzimas e ou microrganismos. Essas alterações resultam em cisão e conseqüentemente transformações químicas e formação de novos grupos funcionais que caracterizam reações de degradação. Essa degradação acarreta mudanças nas propriedades mecânicas, ópticas, descoloração, separação de fase, entre outras (SHAH *et al.*, 2008).

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 a estabilidade e possivelmente sua atividade, não sendo viável este tipo de armazenamento. O armazenamento dessas preparações deve ser realizado sob refrigeração, para ganho na estabilidade do produto. Portanto, a encapsulação do extrato de uva *in natura* e do resíduo da uva em lipossomas pode ser considerada viável e promissora desde que refrigerada.

Tabela 6 - características organolépticas a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$

TEMPERATURA AMBIENTE $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$		Tempo						
Amostra	Características	0h	24h	7 dias	15 dias	30 dias	60 dias	90 dias
Lipossoma puro	Cor	Bege	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A	L.A
	Odor	Característico	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A
	Aspecto	Homogêneo	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A
LUN (Lipossoma + extrato de uva <i>in natura</i>)	Cor	Marrom	S.A	S.A	S.A	S.A	L.A	L.A
	Odor	Característico	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A	L.A
	Aspecto	Homogêneo	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A
LUR Lipossoma de uva residual	Cor	Marrom	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A	L.A
	Odor	Característico	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A	L.A
	Aspecto	Homogêneo	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A
EUN Extrato da uva <i>in natura</i>	Cor	Roxo	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A
	Odor	Característico	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A
	Aspecto	Homogêneo	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A
EUR Extrato da uva residual	Cor	Roxo	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A
	Odor	Característico	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A	L.A
	Aspecto	Homogêneo	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A

Legenda: (A) Alterado, (S.A) Sem alteração, (L.A) Levemente alterado.

Tabela 7 - características organolépticas a $-5 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

REFRIGERADO $-5 \pm 2^{\circ}\text{C}$		Tempo						
Amostra	Características	0h	24h	7 dias	15 dias	30 dias	60 dias	90 dias
Lipossoma puro	Cor	Bege	S.A	L.A	L.A	L.A	L.A	L.A
	Odor	Característico	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A
	Aspecto	Homogêneo	S.A	S.A	S.A	S.A	L.A	L.A
LUN (Lipossoma + extrato de uva <i>in natura</i>)	Cor	Marrom	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A
	Odor	Característico	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A
	Aspecto	Homogêneo	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A
LUR Lipossoma de uva residual	Cor	Marrom	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A
	Odor	Característico	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A
	Aspecto	Homogêneo	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A
EUN Extrato da uva <i>in natura</i>	Cor	Roxo	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A
	Odor	Característico	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A
	Aspecto	Homogêneo	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A
EUR Extrato da uva residual	Cor	Roxo	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A
	Odor	Característico	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A
	Aspecto	Homogêneo	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A

Legenda: (A) Alterado, (S.A) Sem alteração, (L.A) Levemente alterado.

Tabela 8 - características organolépticas a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$

ESTUFA $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$		Tempo						
Amostra	Características	0h	24h	7 dias	15 dias	30 dias	60 dias	90 dias
Lipossoma puro	Cor	Bege	S.A	L.A	L.A	L.A	L.A	A
	Odor	Característico	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A	L.A
	Aspecto	Homogêneo	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A
LUN (Lipossoma + extrato de uva <i>in natura</i>)	Cor	Marrom	S.A	S.A	L.A	L.A	L.A	A
	Odor	Característico	S.A	S.A	S.A	S.A	L.A	L.A
	Aspecto	Homogêneo	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A
LUR Lipossoma de uva residual	Cor	Marrom	S.A	S.A	L.A	L.A	L.A	A
	Odor	Característico	S.A	S.A	S.A	S.A	L.A	L.A
	Aspecto	Homogêneo	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A
EUN Extrato da uva <i>in natura</i>	Cor	Roxo	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A	L.A
	Odor	Característico	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A
	Aspecto	Homogêneo	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A
EUR Extrato da uva residual	Cor	Roxo	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A
	Odor	Característico	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A
	Aspecto	Homogêneo	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A	S.A

Legenda: (A) Alterado, (S.A) Sem alteração, (L.A) Levemente alterado.

5.4 Atividade antioxidante dos lipossomas e dos extratos (puro e residual)

O radical estável 2,2-difenil-1-picril hidrazil- 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 IC_{50} , pois quanto menor a concentração necessária do extrato para inibir a oxidação do radical em 50%, melhor a atividade antioxidante. Para o cálculo do IC_{50} foi utilizada a equação da reta, substituindo o valor de y por 50 para obtenção da concentração da amostra com capacidade de reduzir 50% do DPPH (Figura 10). O percentual de inibição de oxidação em função da concentração de LUN, LUR, EUN e EUR estão expressos na Figura 12, 13, 14 e 15 respectivamente.

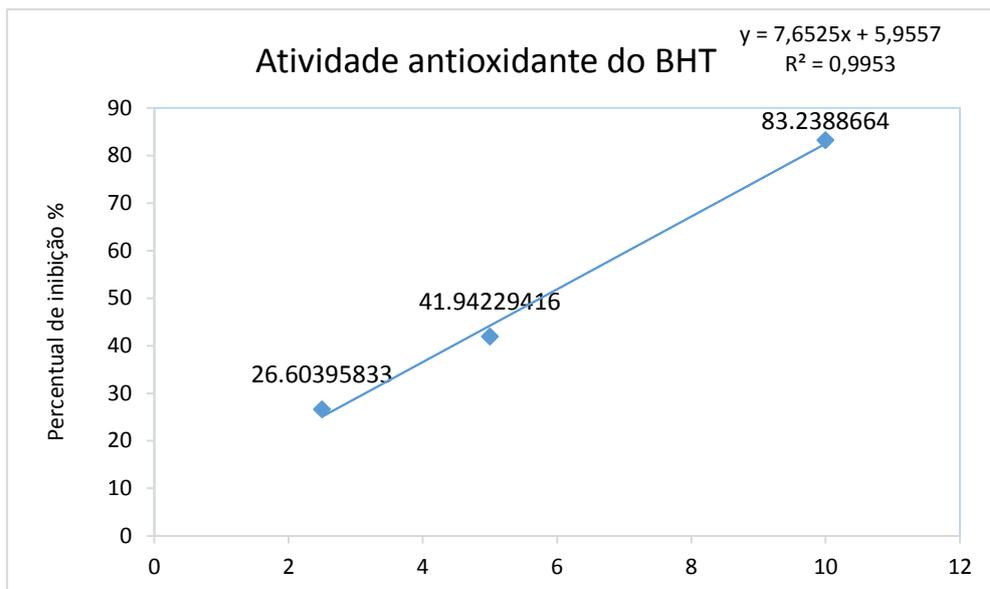


Figura 11 - Atividade antioxidante do BHT

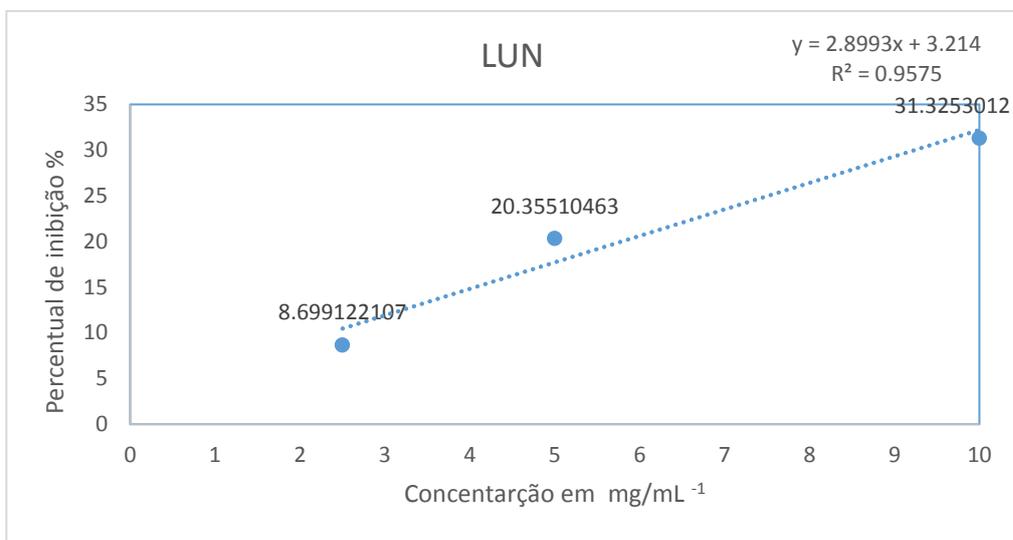


Figura 12 - Atividade antioxidante do lipossoma de uva in natura

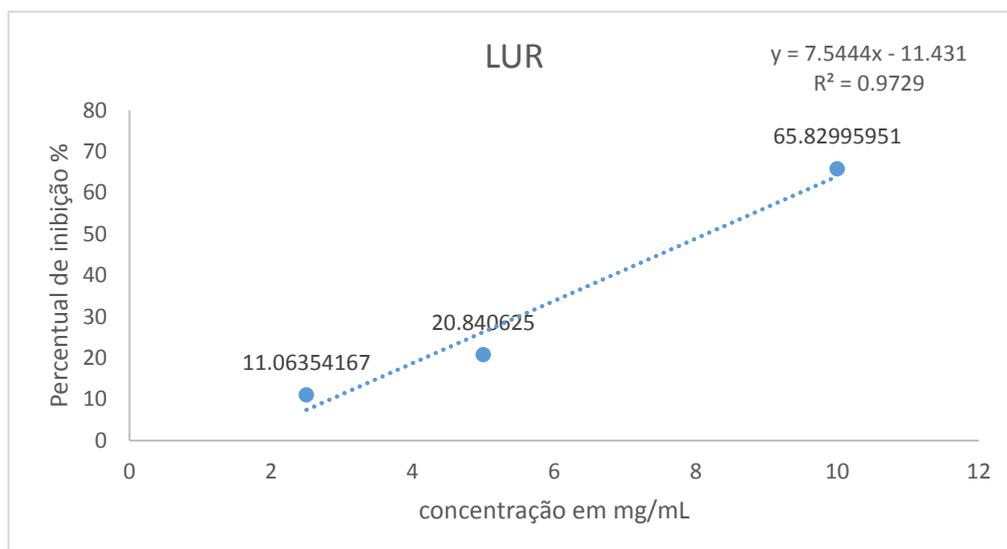


Figura 13 - Atividade antioxidante do lipossoma de uva residual

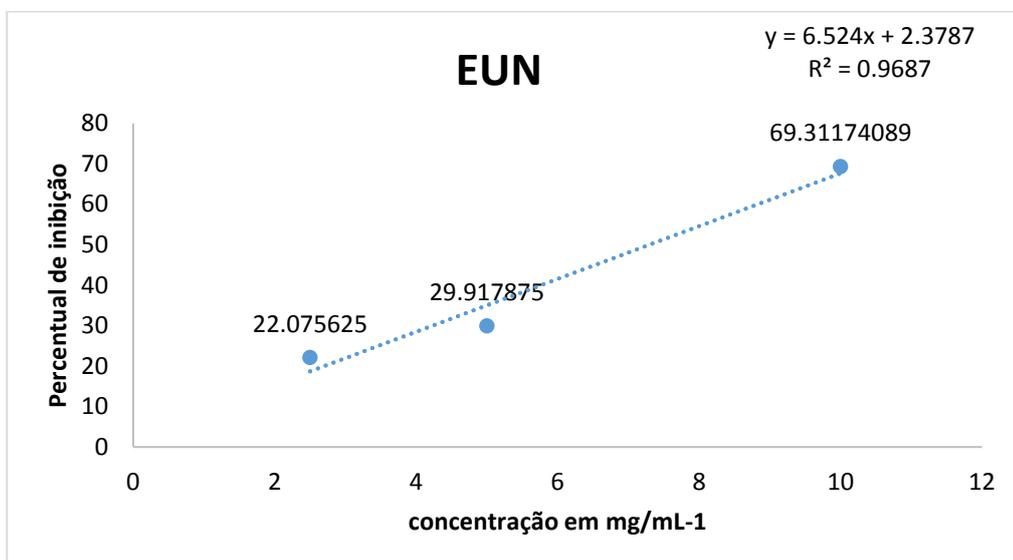


Figura 14 - Atividade antioxidante extrato de uva *in natura*

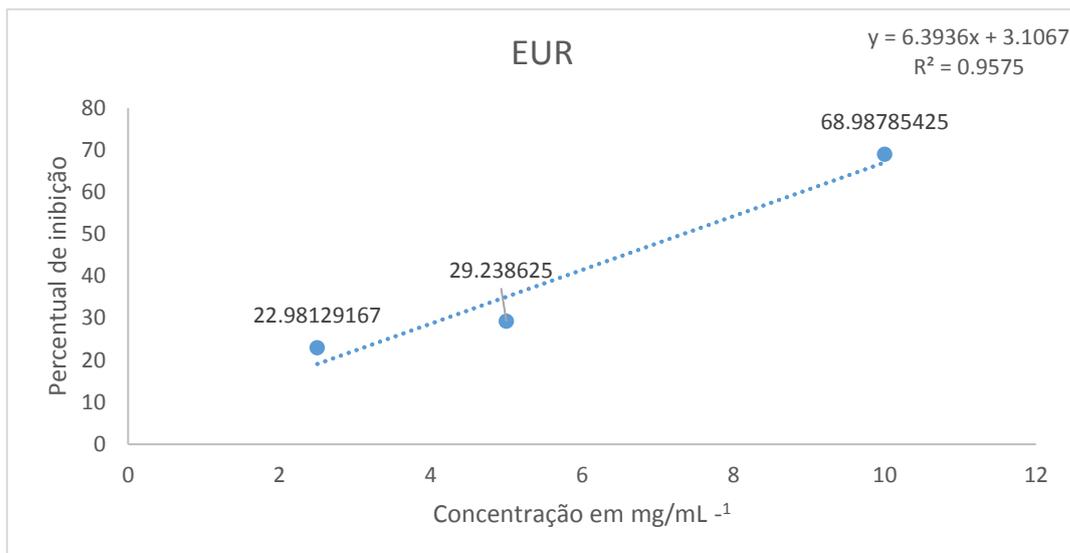


Figura 15 - Atividade antioxidante do extrato de uva residual

Tabela 9 - Atividade antioxidante dos sistemas lipossomados e dos extratos.

Amostras	IC 50
BHT	5,75 mg/mL ⁻¹
Sistema lipossomado contendo extrato da uva <i>in natura</i>	16,13mg/mL ⁻¹
Sistema lipossomado contendo extrato de uva residual	5,11 mg/mL ⁻¹
Extrato da uva <i>in natura</i>	7,29 mg/mL ⁻¹
Extrato de uva residual	7,33 mg/mL ⁻¹

A medida do IC₅₀ expressa (tabela 9) a quantidade de antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH. O extrato de uva natural apresentou valor de IC₅₀ 7,29 mg/mL⁻¹ muito próximo aos 7,33 mg/mL⁻¹ do extrato de uva residual. Esses dados indicam um bom potencial antioxidante nos extratos

Dentre as amostras encapsuladas, o lipossoma de uva *in natura* obteve o maior IC₅₀, quando comparada ao residual. O que significa que serão necessários 5,11 mg/mL⁻¹ do lipossoma de uva residual para a redução de 50% do DPPH, enquanto que para o lipossoma de uva *in natura* serão necessários 16,13 mg/mL⁻¹ para que aconteça a mesma redução do radical, esse sistema possui uma atividade antioxidante menor quando comparada ao lipossoma de uva residual. Uma vez que quanto menor o valor de IC₅₀, maior a atividade antioxidante do lipossoma. O

controle positivo com BHT e o lipossoma de uva residual obtiveram respectivamente 5,75 e 5,11 mg/mL⁻¹ de IC50, esses dados evidenciam o potencial desse lipossoma como uma promissora fonte de atividade antioxidante, o que é bem interessante, uma vez que um dos objetivos desse trabalho é avaliar e comprovar a capacidade antioxidante das amostras envolvidas, uma vez que essas substâncias geralmente têm ação antienvhecimento e anti-inflamatórias.

A atividade antioxidante das amostras analisadas neste estudo foram mensuradas de acordo com o método da redução do radical livre DPPH. Os resultados obtidos no presente estudo confirmam a presença de compostos antioxidantes na uva. Assim, pode se observar a variação do percentual de sequestro do radical livre DPPH pela concentração dos extratos e sistemas lipossomados na Figura 15.

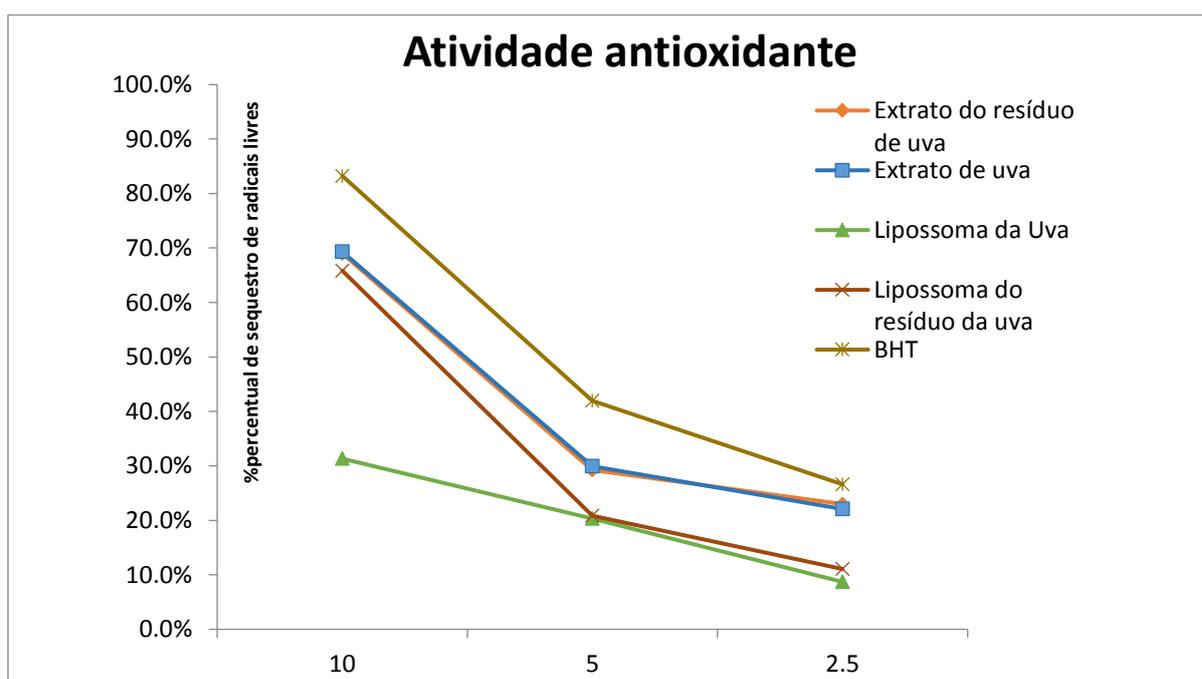


Figura 16 - Percentagem de sequestro de Radicais Livres nas amostras BHT, EUR, EUN, LUR e LUN

Ao comparar as curvas obtidas, nota-se que as inclinações das curvas do extrato de uva e do resíduo de uva são muito próximas da inclinação do controle positivo BHT, ou seja, os extratos obtidos são capazes de atuar como antioxidante.

Ao observar as curvas produzidas pelas diferentes concentrações do extrato de uva e do extrato de resíduo da uva, infere-se que ao aumentar as concentrações desses extratos na solução eles aumentam seu percentual de sequestro de radicais livres, entendendo que os responsáveis pela atividade antioxidante ficaram mais disponíveis quando foram utilizadas concentrações maiores.

As amostras (10 mg/mL⁻¹) apresentaram os maiores índices no sequestro de radicais livres. O controle positivo com BHT, mostrou superioridade as demais amostras, inibindo 83 % dos radicais livres. Os extratos de uva *in natura* e do resíduo, nessa concentração também apresentaram índices (respectivamente 69,31 e 68,98%) satisfatórios no sequestro de radicais livres nessa concentração. Esses valores são superiores a atividade de sequestro de radicais livres apresentado pelo extrato de uva Niágara 44,47% e aos 47,29% do extrato de uva Izabel, ambos analisados na concentração de 100 mg.mL⁻¹ (SHIRAHIGUE, 2008).

A elevada atividade antioxidante averiguada no extrato do resíduo de uva obtidas desse trabalho, são semelhantes ao valores obtidos por Rockenbach *et al.*, (2008) que determinaram o teor da atividade antioxidante do bagaço de uva (*Vitis vinifera*) de duas variedades (Tannat e Ancelota). Desta forma, o aproveitamento do resíduo do processamento de uva é bastante interessante devido a elevada atividade antioxidante com potenciais benefícios para a saúde, além de ser um resíduo abundante e de baixo custo. A recuperação de compostos antioxidantes oriundos desses resíduos poderia representar um avanço significativo na manutenção do equilíbrio do meio ambiente. Esta situação explica o interesse crescente em explorar os subprodutos da vinificação (ALONSO, 2002).

O lipossoma do resíduo de uva na concentração 10 mg/mL⁻¹ se comportou de maneira semelhante aos extratos e BHT, assim pode se dizer que a encapsulação nessa concentração foi eficaz para proteger as substâncias presentes no sistema, o que não ocorreu nas concentrações de 5,0 e 2,5 % mg/mL⁻¹ onde a encapsulação não foi eficaz para proteger as substâncias presentes no sistema lipossomado de resíduo de uva.

Ao observar a curva produzida pelo lipossoma de uva, a concentração 10 mg/mL⁻¹ apresentou o menor percentual de sequestro de radicais livres dentre todas as amostras avaliadas, o extrato de uva *in natura* nessa mesma situação apresentou o dobro da atividade antioxidante. A concentração de 5 mg/mL⁻¹ foi semelhante ao

obtido pelo lipossoma de uva residual e próximos aos obtidos pelos extratos de uva *in natura* e residual comprovando uma ação semelhante no sequestro de radicais livres. Porém, quando se diminui a concentração do lipossoma de uva para $2,5 \text{ mg/mL}^{-1}$ sua ação foi a menor dentre todas as amostras de diferentes diluições assim pode-se dizer que a encapsulação não foi eficaz para proteger as substâncias presentes no sistema lipossomado de resíduo de uva.

Esses valores diferem dos obtidos por Santana Neto (2015) que ao avaliar a concentração da atividade antioxidante dos lipossomas contendo ácidos triterpênicos obteve maiores percentuais de sequestro de radicais livres na concentração de $2,5 \text{ } \mu\text{g/mL}$ e menor em $10 \text{ } \mu\text{g/mL}$.

Ao avaliar os sistemas lipossomados, a curva produzida pelo lipossoma do resíduo da uva residual encontra-se próxima as curvas obtidas pelo extrato de uva *in natura* e residual, sendo a inibição de radicais livres maior nos EUR e EUN.

Os lipossomas mostraram inibição do radical em todas as concentrações testadas. A inclinação da reta (Figura 15), demonstra um decaimento da atividade antioxidante ao diminuir as concentrações dos sistemas, tornando-os menos biodisponíveis, diminuindo sua ação antioxidante. Todas as amostras de extratos encapsulados em lipossomas apresentaram atividade antioxidante, isto se deve a possibilidade do lipossoma como material encapsulante.

5.5 Determinação dos flavonóides totais

Os flavonóides são uma classe de metabólitos secundários vegetais de natureza fenólica, que possuem notável capacidade antioxidante. Catequinas e epicatequinas, por exemplo, têm demonstrado alta capacidade antioxidante e inibição da proliferação celular (FARIA,2006). Estão presentes, principalmente, nas cascas e sementes das uvas (MEYER *et al.*,1997)

A quantificação dos flavonoides foi realizada através de curva de calibração da quercetina, representada pela Figura 16. A equação da reta y , foi usada para determinar a concentração em mg de quercetina, onde x corresponde a concentração de quercetina e y corresponde a absorbância da amostra. O resultado do teor de compostos fenólicos foi expresso como equivalente de ácido gálico (mg^{-1}).

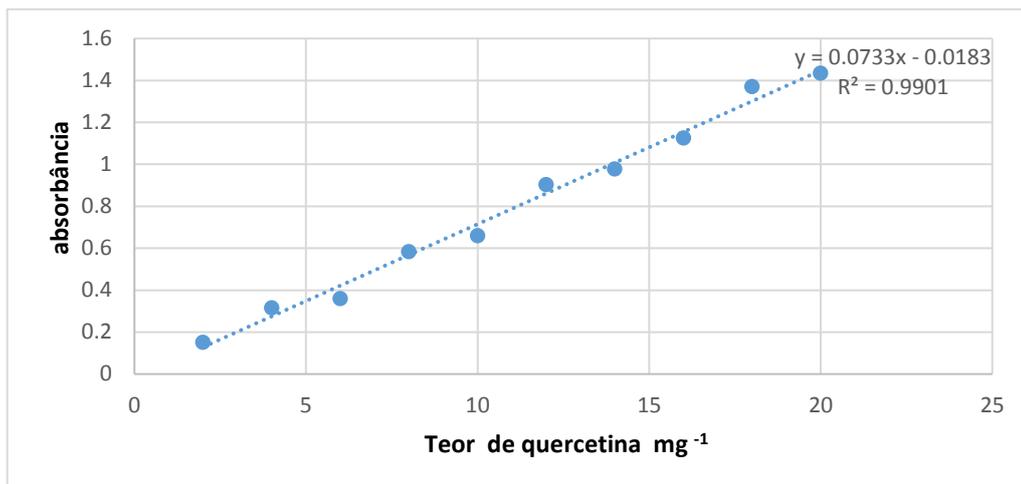


Figura 17 - Curva padrão da quercetina

A figura 17 mostra os resultados para a determinação do teor de flavonóides nas amostras avaliadas.

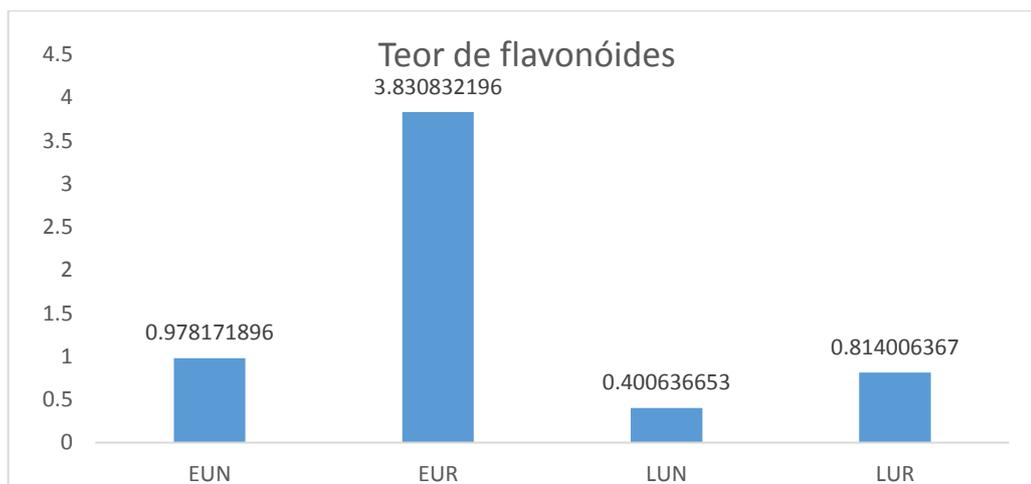


Figura 18 - Flavonóides totais expressos em mg⁻¹

As sementes e casca de uva contêm flavonóides como a catequina, epicatequóna, quercetina e antocianinas, que são fontes ricas de antioxidantes, em estudos *in vitro* foram eficientes na inibição do colesterol LDL (O'BYRNE *et al.*,2002).

Em uvas o perfil de flavonóides é variável em decorrência dos distintos cultivares e das respostas biológicas (ABE *et al.*,2007). 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.

O extrato da uva residual avaliado nesse trabalho apresentou teores de flavonóides de $3,83 \text{ mg}^{-1}$ superiores aos $0,97 \text{ mg}^{-1}$ demonstrados pelo extrato da uva *in natura*. Meyer e colaboradores (1997) realizaram um estudo em relação aos conteúdos de flavonóides em uvas da variedade Cabernet Sauvignon; As bagas analisadas com as sementes apresentaram cerca de 33 mg^{-1} de flavonoides. Após a retirada das sementes não houve constatação de flavanóis nas bagas, enquanto que em uvas da variedade Petite Sirah, os valores observados foram $1,47$ e $23,3 \text{ mg}^{-1}$, respectivamente, para uvas sem e com as sementes.

Ao efetuar uma comparação entre os sistemas lipossomados, o lipossoma de uva residual apresentou o dobro do teor de flavonóides em comparação ao lipossoma de uva *in natura*. Ao comparar os lipossomas com os respectivos extratos é possível averiguar que após a encapsulação os extratos obtiveram teores de flavonóides inferiores.

Diversos métodos e sistemas de solventes vêm sendo usados para a extração de compostos fenólicos em materiais vegetais (CHAVAN; SHAHIDI; NACZK, 2001). O solvente e a sua polaridade podem afetar a transferência de átomos de hidrogênio, que é fundamental na medida da capacidade antioxidante. A presença de compostos não antioxidantes nas soluções testadas também pode afetar os resultados (PÉREZ-JIMÉNEZ; SAURA-CALIXTO, 2006).

Rockenbach *et al.*, (2008), avaliaram o conteúdo total de fenólicos, antocianinas e a capacidade antioxidante do extrato de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) de duas variedades, Tannat e Ancelota, utilizando diferentes sistemas solventes, concluiu que o solvente utilizado na extração de bagaço de uva influencia diretamente nos conteúdos de fenólicos totais, antocianinas e atividade antioxidante dos extratos. Os Compostos fenólicos totais foram mais extraídos em acetona (50 e 70%) enquanto que as antocianinas foram mais bem extraídas em etanol (50 e 70%).

Os valores demonstraram que o teor de flavonóides nas amostras encapsuladas tiveram valores inferiores quando comparadas com os extratos. Uma possível explicação a esse fato, tem como base o solvente utilizado na extração. Os sistemas lipossomados contêm substâncias que são solubilizadas no solvente do sistema escolhido. Estágios adicionais podem ser necessários para purificar o isolado e

remover substâncias fenólicas e não-fenólicas indesejáveis. Por outro lado, essas mesmas amostras apresentaram atividade antioxidante satisfatória, o que é interessante para as indústrias cosméticas e alimentícias.

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.

5.6 Determinação dos fenólicos totais

A quantificação de fenólicos totais foi realizada através de curva de calibração de ácido gálico, representada pela Figura 18. A equação da reta $y = 0,045x - 0,1401$, 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.

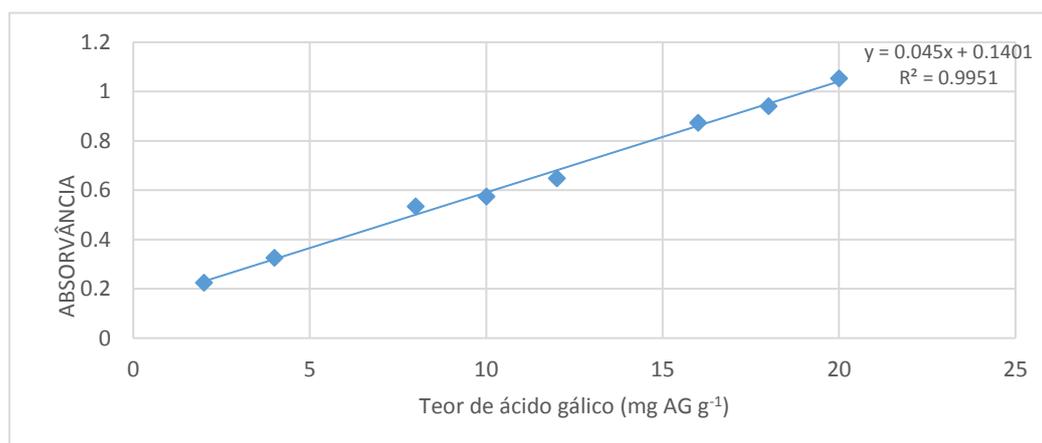


Figura 19 - Curva de Calibração de ácido gálico

O método de Folin-Ciocalteu permite quantificar compostos fenólicos presentes nas amostras, os quais têm a capacidade de ligar-se a radicais livres, inibindo processos oxidativos. A figura 19 mostra os resultados 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.

O resíduo de uva é composto em sua totalidade por sementes e cascas de uvas, essas partes são responsáveis por acumular a maior parte dos compostos fenólicos. Bustamante *et al.*, (2008), citam que o bagaço de uva possui elevados teores de compostos fenólicos com ação fitotóxicas o que dificulta o seu descarte ou a utilização direta como adubo ou ração animal. Contudo estes mesmos compostos apresentam bioatividade em humanos sendo utilizado na prevenção de doenças crônicas graves como doenças cardiovasculares e câncer (LEIFERT; ABEYWARDENA, 2008; PETTI; SCULLY, 2009).



Figura 20 - Fenólicos totais expressos em mg AG⁻¹

O extrato de uva *in natura* apresentou um teor de compostos fenólicos de 20,00 mg/mL esse valor foi inferior aos 27,76 mg/mL obtido pelo extrato de uva residual. 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.*, 2007).

O teor de compostos fenólicos do extrato do resíduo 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 bagaço de uva Isabel. A composição química e propriedades biológicas evidenciadas em estudos com extratos de uva *in natura* e residual demonstram altos valores de compostos fenólicos, os quais têm demonstrado atividades antioxidantes (SHIRAHIGUE, 2008).

O extrato de uva vem sendo citado como um antioxidante natural pela literatura. Os resultados obtidos nesse trabalho para o extrato de uva *in natura* e residual

demonstraram potencial antioxidante, atuando como inibidores de radicais livres ou em sinergismo com o antioxidante sintético.

Os lipossomas obtiveram valores similares ou superiores aos obtidos pelos respectivos extratos. Assim, pode se concluir que extratos ao serem encapsulados mantiveram ou aumentaram as concentrações de compostos fenólicos o que é interessante, uma vez que os compostos fenólicos presentes na uva possuem ação antioxidante conhecida e por essa razão podem ser empregados na indústria de alimentos e cosméticos (PACHECO-PALENCIA; DUNCAN; TALCOTT ,2009).

5.7 Espectro de absorção UV-Vis

A determinação de analitos por espectrofotometria UV-Vis tem que obedecer a lei de Beer que descreve a relação entre a absorvância e a concentração apenas para baixas concentrações de analitos. Isso, pois, com o aumento da concentração dos analitos, as moléculas tornam-se mais próximas e a interação entre elas podem afetar absorvância. Além disso, altas concentrações de outros compostos, tais como eletrólitos podem alterar a absorvância molar do analito por interações eletrostáticas. Em geral, estes efeitos não são muito significativos se as concentrações são menores do que $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (SKOOG *et al.*, 2006). Assim, observa-se que não houve interferências na determinação de ácido gálico (AG), utilizado como marcador interno, pelo método proposto uma vez que as soluções utilizadas estão na ordem de concentração de $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e, dessa forma, obedecem a lei de Beer.

Os espectro de absorção para o complexo EUN, EUR, LUN e LUR-AG pode ser visualizado na Figura 20 a, b, c e d, respectivamente. Observa-se que com o aumento da concentração de AG, ocorre uma diminuição da absorvância da solução para as amostras, exceto para o lipossoma de uva natural.

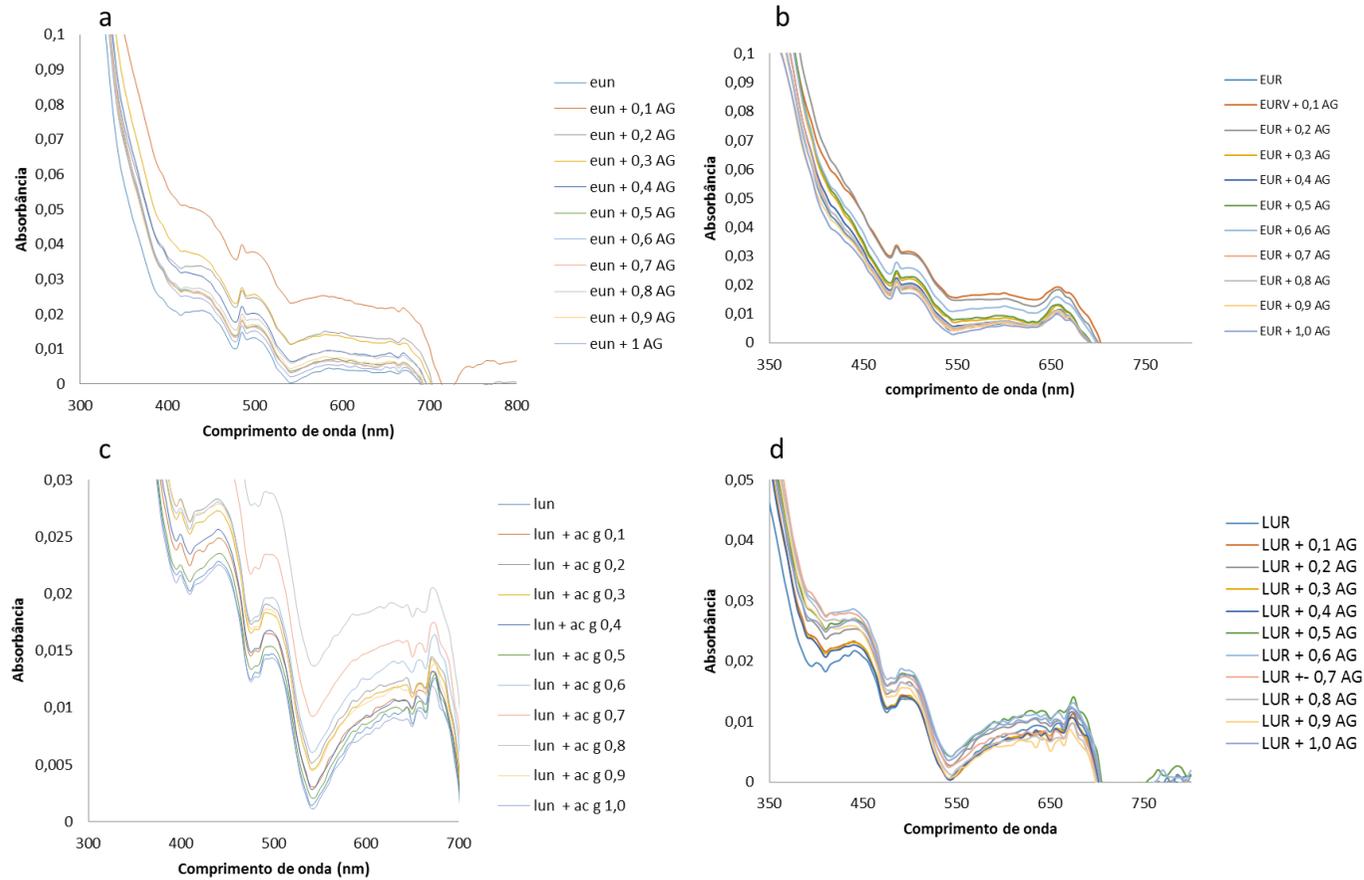


Figura 21 - Espectro de absorvância de 350 a 700 nm de (a) extrato de uva natural e ácido gálico; (b) extrato de uva residual e ácido gálico; (c) Lipossoma natural e ácido gálico; (d) Lipossoma residual e ácido gálico.

5.8 PCA dos espectros de absorção no UV-VIS das amostras

Na análise de componentes principais (PCA) obtida com os espectros de absorção no UV-VIS das amostras verificou-se que foram necessários 2 componentes principais para explicar 99,95% da variância dos dados (Tabela 10). Para a análise de PCA do perfil dos compostos químicos (dados autoescalados) verificou-se que quatro componentes principais (PC) foram necessárias para explicar 99,44% da variabilidade dos dados. A Figura 21 mostra o gráfico de cotovelo em que se pode verificar que é necessário selecionar os quatro primeiros componentes principais, pois a partir deste ponto ocorre a estabilização da inclinação na curva.

Tabela 10 - Percentagem de Variância capturada pelo modelo PCA

PC	Auto valor	% de variância capturada com este PC	% de variância capturada
1	7,95501	99,44%	99,44%
2	0,04062	0,51%	99,95%
3	0,00237	0,03%	99,98%
4	0,00106	0,01%	99,99%
5	7,44E-4	0,01%	100,00%
6	1,21E-4	0,00%	100,00%
7	7E-5	0,00%	100,00%
8	0	0,00%	100,00%

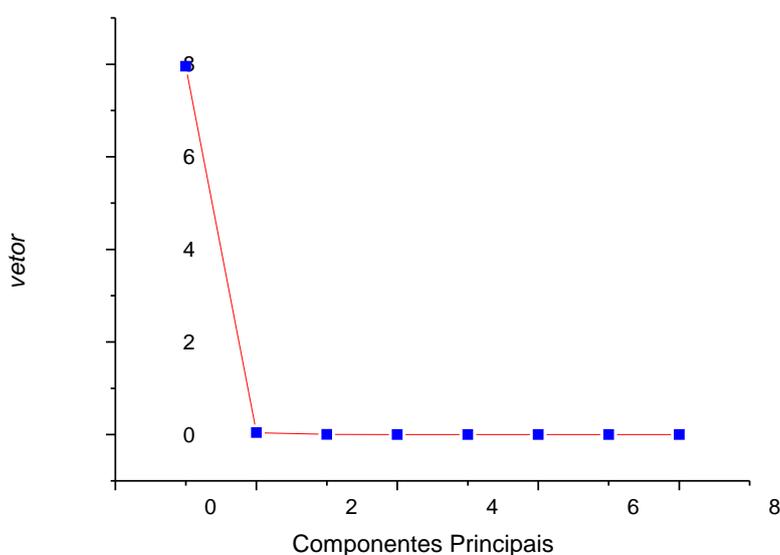


Figura 22 - Gráfico de Autovalor x PC

Analisando a distribuição das amostras no gráfico de PC1xPC2 (Figura 22), é possível observar que na primeira componente principal, as amostras EUR, EUR', e EUN' apresentam os escores mais positivos em PC2 e as amostras encontram-se próximas umas das outras nestas duas componentes. As amostras LUR e LUN apresentam os escores mais negativos e se separam das demais.

Esta análise possibilitou a visualização da formação de dois grupos dentro do conjunto amostral. Na Figura 22, um grupo encontra-se sobre o lado direito superior do gráfico compostos por extratos de uva. Já o outro agrupamento localizado no lado direito inferior e representando, quase que totalmente pelas amostras encapsuladas dos respectivos extratos e uma amostra do EUN, uma possível explicação para esse resultado tem como base a origem em comum das amostras, logo a região produtora também pode ter sido responsável por essa agregação. Outra possível explicação são os resultados de absorvância apresentados pelas amostras de EUN, LUN e LUR nas concentrações de 0,5 a 1,0 mg mL⁻¹ AG, os menores valores de absorvância pode ter gerado essa segregação.

As amostras EUR e EUN, apesar de serem de variedades diferentes, são produzidas na mesma região no Vale do São Francisco. Esses resultados se assemelham aos obtidos por Mota (2013), que ao utilizar da mesma ferramenta para avaliar a qualidade dos vinhos produzidos, verificou que a região era a principal causa na diferenciação do vinho. Além disso, tal fato pode estar relacionado com os nutrientes do solo da região, uma vez que influenciam tanto no pH quanto no teor de metabólitos da videira.

De fato, não existem diferenças significativas entre o extrato de uva residual e natural quanto a presença de ácido gálico como marcador interno, bem como não se apresenta distinto quanto ao extrato de uva residual. Por outro lado, diferem-se das demais amostras que são mais discrepante frente as análises por UV-Vis.

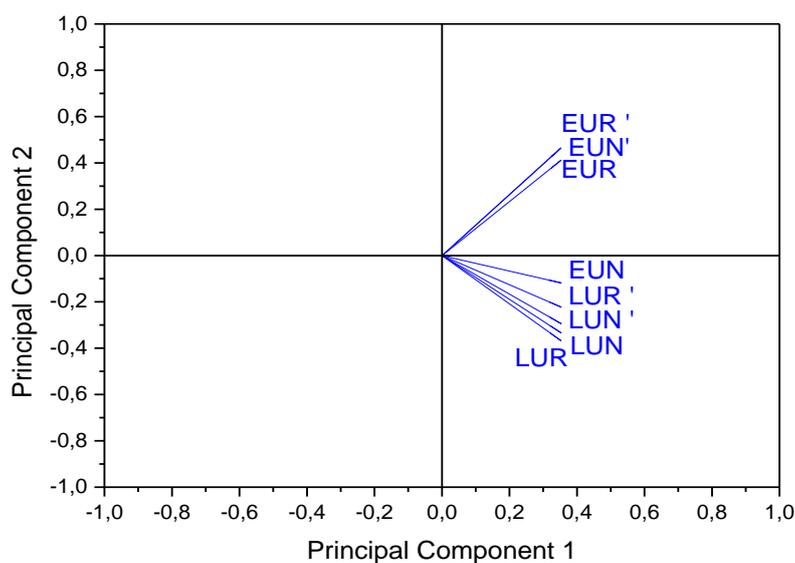


Figura 23 - PC1xPC2 de espectros de absorção no UV-VIS para amostras de EUR, EUN, LUN, LUR. As siglas com 'referem-se a amostra com adição de ácido gálico.

5.9 Análise univariada das amostras

A Tabela 11 apresenta as absorvâncias encontradas nas leituras da amostra EUN pura e adicionada dos padrões, no comprimento de onda de 485 nm.

Tabela 11 - Leituras observadas para a adição de padrão na amostra EUN, EUR, LUN E LUR, em comprimento de onda de 485 nm

Concentração (mg mL ⁻¹)	Absorbância				
	AG	EUN	EUR	LUN	LUR
0		0,014866	0,033812003	0,013077	0,015682
0,1		0,039806	0,024035241	0,015000	0,007161
0,2		0,032807	0,022457936	0,017736	0,005951
0,3		0,027712	0,024935204	0,016915	0,008158
0,4		0,022198	0,028000052	0,011247	0,011213
0,5		0,018217	0,021450624	0,013835	0,005034
0,6		0,018153	0,021711229	0,018136	0,005353
0,7		0,018035	0,020454777	0,022190	0,004315
0,8		0,019928	0,019327357	0,027730	0,003190
0,9		0,018710	0,020806571	0,017158	0,004355
1,0		0,016713	0,033812003	0,012728	0,015682

A Figura 23 mostra a curva obtida a partir das absorvâncias encontradas para a adição do padrão à amostra EUN (a), EUR (b), LUN (c) e LUR (d). Pode-se observar a partir desta curva uma grande correlação entre as absorvâncias e concentrações dos padrões, uma vez que o valor de R-quadrado se aproxima a 1.

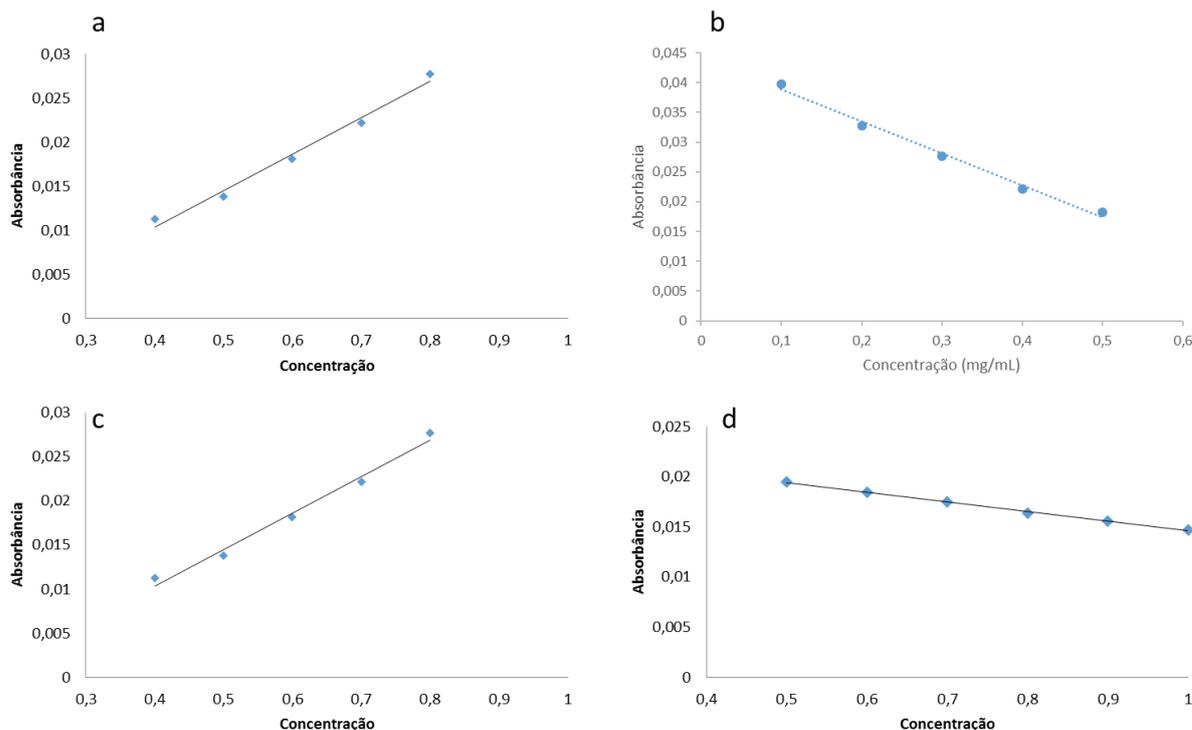


Figura 24 - Curva de calibração de ácido gálico para as amostras: (a) EUN, (b) EUR, (c) LUN e (d) LUR.

A tabela 12 apresenta a equação da reta obtida através da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, que indicam a existência de relação entre as áreas obtidas e a concentração de ácido gálico, ou seja, existe evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão (SHABIR, 2003). De fato, ao aplicar a equação da reta para determinação da concentração negativa de AG nas amostras quando a absorvância (y) cai a zero, obtém-se o valor de 82,34, 109,80, 1,50 e 252,08 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ para EUN, EUR, LUN e LUR, respectivamente.

Tabela 12 - Equação da reta para as amostras EUR,EUN,LUR,LUN

	Equação da reta	Concentração de AG (mg.mL ⁻¹)
EUN	$y = -0,0234x + 0,0413$	83,34
EUR	$y = 0,0673x - 0,0739$	109,80
LUN	$y = 0,0413x - 0,0062$	1,50
LUR	$y = -0,0096x + 0,0242$	252,08

Em alguns casos em análise química, a absorvância é inversamente proporcional a mudanças na concentração do analito (MARCZENKO; BALCERZAK, 2000). Alguns trabalhos na determinação de flúor pelo método SPADNS apresenta o mesmo padrão de perda de absorvância com o aumento da concentração do analito (MOTTER *et al.*, 2011; BANDINI *et al.*, 2003; Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 2013).

O padrão da curva de calibração possuir coeficiente angular negativo é encontrado, também, em algumas análises químicas tais como na quantificação de α -polilisina (GROTZKY *et al.*, 2010), que apresenta excelente correlação entre a absorvância e a concentração da amostra em análise. Nesta metodologia o corante carregado negativamente interage com um policatiônico formando o complexo α -PDL conduzindo a uma precipitação quantitativa e levando a diminuição na intensidade da cor azul do sobrenadante da solução (SHEN *et al.*, 1984). Além disso, na determinação de metabissulfito por UV-Vis com fucsina, o mesmo padrão de comportamento é verificado (SILVA *et al.*, 2010).

6. CONCLUSÃO

A uva *in natura* e o resíduo contém quantidade elevada de fenólicos com conhecida ação antioxidante. Por essa razão tornam-se interessantes ao ponto de vista industrial uma vez que podem ser úteis em formulações cosméticas para prevenção e tratamento de desordens cutâneas relacionadas aos radicais livres e processo oxidativo.

Nas condições experimentais do presente trabalho, concluiu-se que é viável a encapsulação tanto do extrato de uva quanto do resíduo em lipossomas, uma vez que foi observada a formação de vesícula na microscopia. Os resultados das análises física vem comprovar que as amostras armazenadas em temperaturas elevadas como 35 °C ou mesmo temperatura ambiente perdem estabilidade e possivelmente sua atividade, não sendo viável este tipo de armazenamento. O armazenamento dessas preparações deve ser realizado sob refrigeração, para ganho na estabilidade do produto.

O teor de compostos fenólicos não apresentou diferença significativa entre as amostras compostas de extratos e lipossomas. Contudo, ao avaliar o teor de flavonóides, as amostras do extrato do resíduo de uva apresentaram valores expressivos enquanto que as demais amostras tiveram valores inferiores. O lipossoma de uva apresentou o menor teor de flavonóides entre as amostras analisadas, podendo atribuir esse fator a maior presença de ácidos fenólicos do que flavonóides nas amostras.

A análise de PCA mostrou uma tendência no agrupamento, uma vez que as amostras de extratos formaram um grupo e a dos sistemas lipossomados outros. Uma possível explicação para esse agrupamento é o perfil físico-químico e localidade das amostras.

Analisando os resultados apresentados ao longo deste estudo o extrato do resíduo apresentou atividade antioxidante superior ao extrato de uva *in natura*, mas com uma diferença discreta entre eles. Por outro lado, quando encapsulados, tais extratos apresentaram perfil antioxidantes inferiores quando comparados aos extratos originais, pois o lipossoma tem a capacidade de proteção dos bioativos. Entretanto, os extratos puros quanto em sistemas lipossomais apresentam potencial antioxidante, contudo inferiores, quando comparados com o antioxidante comercial

(BHT), provavelmente devido ao fato, deste ser uma substância pura. Porém, a utilização de substâncias antioxidantes sintéticas requer cautela por serem substâncias com potencial toxicológicas e carcinogênicas. Além disso, esses antioxidantes sintéticos já estão proibidos na Europa e Estados Unidos e no Brasil seu uso tem restrições.

Desta forma, a substituição de antioxidantes sintéticos por produtos naturais, proporcionaria melhor qualidade dos alimentos e à saúde. Além disso, a utilização de resíduos provenientes da fabricação de vinho e suco torna-se uma alternativa viável para dar um destino mais nobre a esses resíduos por possuírem excelentes constituintes nutricionais e compostos bioativos.

7. REFERÊNCIAS

- ABE, L. T.; MOTA, R. V.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 2, p. 394-400, 2007.
- ALLEN, J.C.; HAMILTON, R.J. Rancidity in foods. London: **Applied Science**. 1983.199p
- ALLEN, M.; CULLIS, P.R. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**.v.21, n. 65, p 36-48, 2013.
- ALONSO, A. M. Determination of antioxidant activity of wine byproducts and its correlation with polyphenolic content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 21, p. 5832-5836, 2002.
- ALVES, C.Q.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; BAHIA, M.V.; AGUIAR, R.M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Quim Nova**. v.33, n. 10, p. 2202-2210.2010.
- ÁVILA, L. D. **Enologia I**. Bento Gonçalves: EAFPJK, Polígrafo da disciplina de Enologia I. 1999. 64p.
- BAGCHI, D. *et al*. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: Importance in human health and disease prevention. **Toxicology**, v. 148, n.4. p. 187–197, 2000.
- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n.1, p.191-203, 2006.
- BANDINI, T. B.; VILELA, M. A. P. & MACÉDO, J. B. Utilização do método colorimétrico spadns para análise de fluoreto em águas de abastecimento em Juiz de Fora (MG). **Revista Analytica**, n.4, v.21, p.59-64, 2003.
- BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim Nova**. v. 29, n.1, p. 113-123.2006
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **25 ANOS DE QUIMIOMETRIA NO BRASIL** **Quim. Nova** v.29, n.12, p.1401, 2006.
- BENZIE, I. F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 47, n.13, p. 233-261, 1996.
- BIRSE, M.J. **The color of red wine**. 2007. Tese de Doutorado. The University of Adelaide. School of Agriculture, Food & Wine. Faculty of Sciences, 2007.
- BONILLA, F.; MAYEN, M.; MERIDA, J.; MEDINA, M. Extraction of phenolic compounds from grape marc for use as food lipid antioxidants. **Food Chemistry**, v.66, p.209-215, 1999.
- BRANNON-PEPPAS, L. Controlled release in the food and cosmetics industries. In: EL-NOKALY, M. A.; PIATT, D. M.; CHARPENTIER, B. A. (Eds.). **Polymeric Delivery Systems: Properties and Applications**. Oxford: Oxford University Press,. chap. v. 25.n 3, p. 42-52, 1993.
- BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. -IBGE. **Levantamento Sistemático da produção Agrícola**. v.27 n.01 p.1-85 janeiro.2014 Rio de Janeiro jan/2014.Disponível em [ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_\[mensal\]/Fasciculo/lspa_201401.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_[mensal]/Fasciculo/lspa_201401.pdf). Acesso 21/01/2015.

- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos**. Brasília: ANVISA, 2004. 52 p.
- BUSSOLO, T.B.; THOME, V.A. **Efeitos dos extratos de bagaço de uva Niágara e Isabel na reologia das massas e na qualidade do pão de forma**, 2008; Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Tecnologia em Alimentos). Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campos Mourão, 2008.
- BUSTAMANTE, M. A.; MORAL, R.; PAREDES, C.; PÉREZ-ESPINOSA, A.; MORENO-CASELLES, J.; PÉREZ-MURCIA, M. D. Agrochemical characterisation of the solid by-products and residues from the winery and distillery industry. **Waste Management**, Amsterdam, v. 28, n.11. 372-380, 2008.
- CALDAS, B.S.; CONSTANTINO, L.V.; SILVA, C. H. G.A.; MADEIRA, T. B.; NIXDORF, S.L. Determinação de açúcares em suco concentrado e néctar de uva: comparativo empregando refratometria, espectrofotometria e cromatografia líquida. **Scientia Chromatographica** .v.7, n. 1, p 53-63, 2015.
- CAMARGO, U. A. Variedades de uva. In: GUERRA *et al.* **Conhecendo o essencial sobre uvas e vinhos**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, p. 17-30, 2009.
- CAMARGO, U.A., OLIVEIRA, P.R.D. (2001) **Melhoramento genético**. In: Leão, P. C. S., ed. Uva de mesa: produção – aspectos técnicos. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p. 14-19. 2001
- CAMPOS, L. M. A. S. Obtenção de extratos de bagaço de uva Cabernet Sauvignon (*Vitisvinifera*): parâmetros de processo e modelagem matemática. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2005
- CANTOS, E.; GARCÍA-VIGUERA, C.; PASCUAL- TERESA, S. de; TOMÁS-BARBERÁN,F. A. Effect of postharvest ultraviolet irradiation on resveratrol and other phenolics of cv.Napoleon table grapes. **Journal of Agricultural, Food Chemistry**, Easton, v. 48, p. 4606-4612, 2000.
- CARRATU, E; SANZINI, E. “Sostanze biologicamente attive presenti negli alimenti di origine vegetable”. **Ann. Ist. Super Sanità**, n. 1, v.41, p.7-16, 2005.
- CARVALHO, J.C.T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P. Compostos Fenólicos Simples e Heterosídicos. In: Simões, C. M. O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; MELLO,J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Ed.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, 2001. 1102 p.
- CATANEO, B. C.; CALIARI, V.; GONZAGA, L.V. Atividade antioxidante e conteúdo fenólico do resíduo agroindustrial da produção de vinho. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 93-102, 2008.
- CATTLE, R.D. The scree test for the number of factors. **Multivariate Behavioral Research**, v. 1, n. 2, p. 245-276, 1966.
- CHAVAN, U. D.; SHAHIDI, F.; NACZK, M. Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.) as affected by different solvents. **Food Chemistry**, v. 75, n.4, p. 509-512, 2001.
- CHILE. Catastro del viñedo chileno 2005. Santiago, Chile. Gobierno de Chile, Min. Agric., **Serv. Agríc Ganad.**, Dep. Prot. Agríc., Subdep. Alcoh. Viñas, 2006. 51p.
- CHOUDHURY, M. M.; ARAÚJO, J. L. P.; LEÃO, P. C. DE S.; RESENDE, J. M.; COSTA, T. S. DA; REIS, C. dos S., **Uva de Mesa Pós-Colheita**. Embrapa Semi Árido (Petrolina-PE). – Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. 55 p.
- D'LENON, L.F.P. Estudo de Estabilidade de Produtos Cosméticos. **Cosmetic & Toiletries**, São Paulo, v. 13, n. 4, p. 54, 62, jul./ago, 2001

- DURÁN, N.; MATTOSO, L. H. C.; MORAIS, P. C. **Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação**. 1 ed. São Paulo: Artlier.2006.
- FARIA, A.; CALHAU, C.; DE FREITAS, V.; MATEUS, N. Procyanidins as antioxidants and tumor cell growth modulators. **J. Agric. Food Chem.** v. 54, n.6, p. 2392-2397, 2006.
- Farmacopeia Brasileira**. 5 ed. Vol. 1 e 2. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010. 808p. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/index.htm. Acesso em: 22 ago. 2015.
- FERREIRA, I. C. F. R.; ABREU, R. Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. **Bioanálise**, v. 4, n. 2, p. 32–39, 2007.
- FLANZY, C. **Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos**. 2 ed. Madrid: AMV Ediciones Mundi-Prensa;2003. 797p.
- FRÉZARD F. Lipossomes: From Biophysics to the design of peptide vaccines. **Braz J Med Biol Res.** n 32, v 2, p-181-899, 1999.
- FRÉZARD, F.; SCHETTINI, D. A.; ROCHA, O. G. F.; DEMICHELI, C. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. **Química Nova**. n.3, v.28, p.161-172, 2005.
- 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.
- GABBARDO, M. **Borras finas e manoproteínas na maturação de vinho tinto Cabernet Sauvignon**. 2009. 62f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS.2009.
- GABRIÉLS, M.; PLAIZIER-VERCAMMEN, J. Physical and chemical evaluation of liposomes, containing artesunate. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Arlington, v.31, p.655-667, 2003.
- GIOVANNINI, E. **Produção de uvas para vinho, suco e Mesa**. 3ª Ed.: Editora Renascença, Porto Alegre, 2008.362 p.
- GIOVANNINI, E. **Produção de uvas para vinho, suco e mesa**. 2. ed. Porto Alegre: Renascença, 2005. 368 p.
- GREGORIADIS, G. **Liposome Technology**. 3rd ed. London: CRC Press,v. 2, 2007. 388 p.
- GROTZKY, A.; MANAKA, Y.; FORNERA, S.; WILLEKE, M. & WALDE, P. Quantification of α -polylysine: a comparison of four UV/Vis spectrophotometric methods. **Analytical Methods**.n.2, p. 1448–1455, 2010. DOI: 10.1039/c0ay00116c
- GUERRA, C.C.; F. MANDELLI, J.; TONIETTO, M.C.; ZANUS, U.A. Camargo. 2005. Conhecendo o essencial sobre uvas e vinhos. Bento Gonçalves: EMBRAPA **Uva e Vinho**. 68p. (Documentos, 48).
- HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: Possible modes of action. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 205-215, 1996.
- HOGAN, S.; CANNING, C.; SUN, S., SUN, X.; ZHOU, K., Effects of grape pomace antioxidant extract on oxidative stress and inflammation in diet induced obese mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, p.11250-11256, 2010. <http://www.anvisa.gov.br/divulga/public/series/cosmeticos.pdf>>. Acesso em: 22 de mar 2015.

- JACKSON, R. S. Chemical constituents of grapes and wine. In: JACKSON, R. S. **Wine Science Principles and applications**. 3. Ed. San Diego: Academic Press, p. 271-329, 2008.
- JAITZ, L.; SIEGL, K.; EDER, R.; RAK, G.; ABRANKO, L.; KOELLENSPERGER, G.; HANN, S. LC-MS/MS analysis of phenols for classification of red wine according to geographic origin, grape variety and vintage. **Food Chemistry**, v. 122, n. 1, p. 366-372, 2010.
- JENNING, V.; SCHÄFER-KORTING, M.; GOHLA, S. Vitamin A-loaded solid lipid nanoparticles for topical use: drug release properties. **Journal of Controlled Release**, v.66, p.115-126, 2000.
- JONES, M. The History of Lecithin Pluronic Organogel. **International Journal of Pharmaceutical Compounding**. v.7, n. 3, p.180-182, 2003.
- KAISER, H.F. The varimax criterion for analytic rotation in factor analysis. **Psychometrika**, v. 23, n.3, p. 187-200, 1958.
- KOWALSKI, B. R.; (Ed.) Chemometrics: Mathematical and Statistics in Chemistry. NATO ASI series. Série C; vol. 138. D. Riedel Publishing Company, Dordrecht, 1984.
- KHATTREE, R.; NAIK, D.N. **Multivariate data reduction and discrimination with SAS software**. Cary, NC, USA: SAS Institute Inc., 2000. 558p.
- KUHN, G.B., J.L. LOVATEL, O.P. PREZOTTO, O.F. RIVALDO, F. MANDELLI & O.R. SÔNEGO. 1996. O cultivo da videira: **Informações básicas**. 2. ed. Bento Gonçalves, EMBRAPA- CNPQU, 60 p. (EMBRAPA-CNPQU. Circular Técnica, 10).
- KY, I.; LORRAIN, B.; KOLBAS, N.; CROZIER, A. TEISSEDE, P. L. Wine byproducts: phenolic characterization and antioxidant activity evaluation of grapes and grape pomaces from six different french grape varieties. **Molecules**, v. 19, n.19.p. 482-506, 2014.
- LASIC, D.D. "Applications of liposomes". In: *Handbook of biological physics*. Lipowsky, R. and Sackmann, E. (Eds.) **Elsevier Science B.V.**, Menlo Park, p. 491-519, 1995.
- LEÃO, P. C. de S.; POSSÍDIO, E. L. de. Implantação do pomar e manejo da cultura. In: LEÃO, PC. de, SOARES, J.M. (Ed.) **A Viticultura no semi-árido brasileiro**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2000. 366p.
- LEE, K.W.; KIM, Y.J.; LEE, C.Y. Cocoa Has More Phenolic Phytochemicals and a Higher Antioxidant Capacity than Teas and Red Wine. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 51, n. 17, p. 7292-7295, 2003.
- LEIFERT, W. A.; ABEYWARDENA, M. Y. Cardioprotective actions of grape polyphenols. **Nutrition Research**, New York, v. 28, n.11, p.729- 737, 2008.
- LESOIN, L.; BOUTIN, O.; CRAMPON, C.; BADENS, E. CO₂/water/surfactant ternary systems and liposome formation using supercritical CO₂: **A review. Colloids and Surfaces** v.25, n 377, p 1-14, 2013.
- LIRA, M.C.B.; SIQUEIRA-MOURA, M.P.; ROLIM-SANTOS, H.M.L.; GALETTI, F. C. S.; SIMONI, A. R.; SANTOS, N. P.; EGITO, E.S.T.; SILVA, C.L.; TEDESCO, A.C.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. In vitro uptake and antimycobacterial activity of liposomal usnic acid formulation. **Journal of Liposome Research**, v. 19, p. 49-58, 2009.
- MALHEIROS, P. S.; DAROIT, D. J.; BRANDELLI, A. Food applications of liposome-encapsulated antimicrobial peptides. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n.12, p. 284-292, 2010.
- MARCZENKO,Z; BALCERZAK, M. Separation, Preconcentration and Spectrophotometry in Inorganic Analysis Amsterdam: Elsevier, 2001, 528 pp.

- MASCARENHAS, R. J. **Caracterização da maturidade, compostos bioativos e qualidade sensorial de uvas apirênicas no vale do submédio São Francisco** – Tese (Doutorado) 2009.197f.Universidade Federal da Paraíba.João Pessoa, 2009.
- MATSUBARA, S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Conteúdo de miricetina, quercetina e kaempferol em chás comercializados no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 380-385, 2006.
- MEIRA, M.; QUINTELLA, C.M.; PEPE, I.M.; COSTA NETO, P.R.; TANAJURA, A.S.; SILVA, H.R.G. Prediction of properties of biodiesel-diesel blends using spectrofluorimetry and multivariate calibration. **Central European Journal of Chemistry**, v. 10, n. 4, p. 1328-1337, 2012.
- MELO, P.S.; BERGAMASCHI, K.B.; TIVERON, A.P.; MASSARIOLI, A.P.; OLDONI, T.L.C.; ZANUS, M.C.; PEREIRA, G.E.; ALENCAR, S.M. Composição fenólica e atividade antioxidante de resíduos agroindustriais. **Ciência Rural**, v. 41, n.6, p. 1088-1093, 2011.
- MENSOR, L.I., MENEZES, F.S., LEITAO, G.G., REIS, A.S., DOS SANTOS, T., COUBE, C.S., LEITAO, S.G., Screening of Brazilian plants extracts for antioxidants activity by the use of DPPH free radical method. *Phytother. Res.*, v.15, p.127-130, 2001.
- MEYER, A. S.; YI,O.; PEARSON, D. A.; WATERHOUSE, A. L.; FRANKEL, E. N. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation in relation to composition of phenolics antioxidants in grapes (*Vitis vinifera*). **J. Agric. Food Chem.**, v. 45,n.5, p. 1638-1643, 1997.
- MONRAD, J. K. *et al.* Subcritical solvent extraction of anthocyanins from dried red grape pomace. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 2862–2868, 2010.
- MORARU, C.; PANCHAPAKESAN, C.; HUANG, Q.; TAKHISTOV, P.; LIU, S.; KOKINI, J. Nanotechnology: A new frontier in food science. **Food Technology**, Chicago, v. 57, n. 12, p. 24-29, 2003.
- MOTA, M. D.; Determinação de trans-resveratrol em vinhos tintos brasileiros por meio de calibração multivariada. 2013. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, Salvador, 2013.
- MOTTER, J.; MOYSES, S. T.; FRANÇA, B. H. S.; CARVALHO, M. L. & MOYSÉS, S. J. Análise da concentração de flúor na água em Curitiba, Brasil: comparação entre técnicas. **Revista Panamericana de Saúde Publica**, v.29, n.2, p. 120–125, 2011.
- MOURA, M. C. S.; LOPES, A. N. C.; MOITA, G. C.; MOITA NETO, J. M..Estudo Multivariado de Solos Urbanos da Cidade de Teresina. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 429-435, 2006.
- MOURA, M.S.B.; TEIXEIRA, A.H.C.; SOARES, J.M. Exigências climáticas. In: SOARES, J.M.; LEÃO, P.C.S. A Vitivinicultura no semiárido brasileiro. Brasília: **Embrapa Informação Tecnológica**;Petrolina: Embrapa Semiárido, 2009. p. 35-70.
- MOZAFARI, M. R.; KHOSRAVI-DARANI, K.; BORAZAN, G. G.; CUI, J.; PARDAKHTY, A.; YURDUGUL, S. Encapsulation of food ingredients using nanoliposome technology. **International Journal of Food Properties**, v. 11, n. 4, p. 833-844, 2008.
- MURGA, R.; RUIZ, R.; BELTRÁN, S.; CABEZAS, J.L., Extraction of natural complexphenols and tannins from grape seeds by using supercritical mixtures of

- carbondioxide and alcohol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v.48, n.8,p 3408–3412, 2000.
- MUSTRA, C.J.G.O. **Aplicação da técnica de espectrofotometria de absorção atômica na análise de metais e metaloides em amostras biológicas: Preparação de amostras por digestão com a tecnologia microondas**. Lisboa, 2009. Dissertação de Mestrado. Universidade de Lisboa. Faculdade de Medicina de Lisboa. Mestrado em Medicina Legal e Ciências Forenses,2009.
- NACKA, F.; CANSELL, M.; GOUYGOU, J. P.; GERBEAUD, C.; MÉLÉARD, P.; ENTESSANGLES, B. Physical and chemical stability of marine lipidbases liposomes under acid conditions. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 20,n. 22, p. 257-266, 2001.
- NAMIKI, M. Antioxidants/antimutagens in food. **Journal of Nutrition**, Boca Raton, v.29, n.4, p.273-300, 1990.
- NAWAR, W.W. Lipids. In: FENNEMA, O.R. (Ed.). **Food Chemistry**. 2.ed. New York: Marcel Dekker. v.9, n.17, p.139-244, 1985.
- O'BYRNE, D.J.; DEVARAJ, S.; GRUNDY, S.M.; JIALAL, I. Comparison of the antioxidant effects of Concord grape juice flavonoids alpha-tocopherol on markers of oxidative stress in healthy adults. **Am J Clin Nutr**; n. 76: p. 1367–1374, 2002.
- OLIVEIRA, A. Z. M. **Desenvolvimento de formulações cosméticas com ácido hialurônico** - Dissertação de mestrado-Universidade de porto. Portugal. 2009.Paraná, Curitiba, 2009. Disponível em: http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/1884/4631/1/Lapa_FR_2006_dissertacao_Mestrado.pdf. Acesso em: 16 fev. 2015.
- ORAK, H. H. Total antioxidant activities, phenolics, anthocyanins, polyphenoloxidase activities of selected red grape cultivars and their correlations. **Scientia Horticulturae**, v. 111, p. 235-241, 2007.
- PACHECO-PALENCIA, L.A.; DUNCAN, C.E.; TALCOTT, S.T. Phytochemical composition and thermal stability of two commercial açai species, *Euterpe oleracea* and *Euterpe precatoria*. **Food Chemistry** v.115, p.1199–1205, 2009.
- PANERO, F. S.; DA SILVA, H. E. B. Application of exploratory data analysis for the characterization of tubular wells of the North of Brazil. **Microchemical Journal**, v. 88, n. 2, p. 194-200, 2008.
- PEIXOTO, C. **Enologia e outras bebidas**. 2000. 46p. Disponível Em: <<http://opac.iefp.pt:8080/images/winlibimg.exe?key=&doc=69677&img=705>>. Acesso em: 15 de agosto de 2014.
- PEREIRA, G. E.; GUERRA, C. C.; MANFROI, L. Vitivinicultura e Enologia. In: SOARES, J. M.; LEÃO, P. C. S. **A Vitivinicultura no Semiárido brasileiro**. Petrolina: EMBRAPA Semi-Árido, 2009. 756 p.
- PEREIRA, N.; CARNEIRO, S.; SILVESTRE, M.; TELES, N.; FIGUEREIDO DA SILVA, J.; MACHADO, C.M.; PEREIRA, E.C.; DA SILVA, N.H.; HONDA, N.K.; SANTOS MAGALHÃES, N.S. Nanoencapsulation of usnicacid: na attemptto improve antitumor activity and reduce hepatotoxicity. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** v 64, p 154–160, 2006.
- PÉREZ-JIMÉNEZ, J. **Metodología para la evaluación de ingredientes funcionales antioxidantes: efecto de fibra antioxidante de uva en status antioxidante y parámetros de riesgo cardiovascular en humanos**. Tesis (Doctoral) - Programa de Doctorado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, 244 p., Fecha de Lectura: Junio 2007.

- PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Research International**, v. 39, n.7, p. 791-800, 2006.
- PETTI, S.; SCULLY, C. Polyphenols, oral health and disease: A review. **Journal of Dentistry**, Kidlington, v. 37, n.6, p. 413-423, 2009.
- PINTO, M. S. **Compostos bioativos de cultivares brasileiras de morango (Fragaria x ananassaDuch.): caracterização e estudo da biodisponibilidade dos derivados de ácido elágico**. Tese (Doutorado) 2008.Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo, 2008.
- PINTO, M. C.; GARCÍA-BARRADO, J. A.; MACÍAS, P. Resveratrol is a Potent Inhibitor of the Dioxxygenase Activity of Lipoxygenase Journal **Agric. Food Chem.** v. 47, p.4842-4846, 1999.
- PRISTA, L.V. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R.M.R. **Técnica farmacêutica e farmácia galênica**. 3ª ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian; 1990.
- PROESTOS, C.; BAKOGIANNIS, A.; PSARIANOS, C.; KOUTINAS, A.A.; KANELAKI, M.; KOMAITIS, M. High performance liquid chromatography analysis of phenolic substances in Greek wines. **Food Control**, v. 16, n. 4, p. 319-323, 2005.
- RAMALDES, G. A.; DEVERRE, J. R.; GROGNET, J. M.; PUISIEX, F.; FATTAL, E. Use of an enzyme immunoassay for the evaluation of the entrapment efficiency and in vitro stability in intestinal fluids of liposomal bovine serum albumin. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v.143, n. 1, p. 1- 11, 1996.
- RIBÉRAU-GAYON P, GLORIES Y, MAUJEAN A, DUBOURDIEU D. **Tratado de Enología: microbiología del vino – vinificaciones and Tratado de Enología: química del vino – estabilización y tratamientos**. Buenos Aires, Argentina:Editorial Hemisferio Sur. Vol. I, Vol. II. 636 p., 2003, 537 p.
- RIBÉRAU-GAYON, P.; GLORIES, Y.; MAUJEAN, A.; DUBORDIEU, D. **handbook of enology. The chemistry of wine stabilization and treatment. 2. ed. Inglaterra:** John Wiley& Sons, 2006.
- RIDOUT, G., SANTUS, G.; GUY, R. H. Pharmacokinetic considerations in the use of newer transdermal formulations.**Clinical Pharmacokinet.**, Auckland,v.21, n,15, p.114-131, 1988.
- RIZZON, L. A.; MENEGUZZO, J. **Suco de uva**. Brasília: DF: Embrapa Informação Tecnológica; Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2007. 45 p. (Coleção Agroindústria Familiar). Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/11888/2/00081370.pdf. Acesso em 18 agosto de 2015.
- RIZZON, L. A.; MIELE, A. Avaliação da cv. Cabernet sauvignon para elaboração de vinho tinto. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 22, n. 2, p. 192-198, 2002.
- ROCKENBACH, I. I. RODRIGUES, E.; GONZAGA, L.V.; CALIARI, V.; GENOVESE, M.I.; GONÇALVES, A.E.S.S. 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, n. 1, p. 174-179, 2011.
- ROCKENBACH, I.I.; SILVA, G.L.; RODRIGUES, E.; KUSKOSKI, E.M.; FETT, R. Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades Tannat e Ancelota. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v.28, p.238-244, 2008.

- ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C.; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. S.; PASTORE, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 53-60, 2007.
- ROSENBERG, M. **Society and the adolescent self-image**. Princeton: Princeton University Press, 1965. 326 p
- ROSSI JR, J. A.; SINGLETON, V. L. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 16, p.144-158, 1965.
- ROSSING, D.; KAHL, R. e HILDEBRANDT, A. G. Effect of synthetic antioxidants on hydrogen peroxide formation, oxyferro cytochrome P450 concentration and oxygen consumption in liver microsomes. **Toxicology**, v. 3, n.12, p. 67-77, 1985.
- RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; JIMENEZ, J.P.; CALIXTO, F.D.S. Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Comunicado Técnico Embrapa**, n.127, p. 1-4, 2007.
- SACH, L. C **Enología Bandeirantes**: Fundação Faculdades Luiz Meneguel, 2001.119p
- SAGRATINI, G.; MAGGI, F.; CAPRIOLI, G.C.; RICCIUTELLI, M.; TORREGIANI, E.; VITTORII, S. Comparative study of aroma profile and phenolic content of Montepulciano monovarietal red wines from the Marches and Abruzzo regions of Italy using HS-SPME–GC–MS and HPLC–MS. **Food Chemistry**, v. 132, n. 3, p. 1592-1599, 2012.
- SAHOO, S. K.; PARVEEN, S.; PANDA, J. J. The present and future of nanotechnology in human health care. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, Oxford, v. 3, n. 1, p. 20-31, 2007.
- SANTANA NETO, A.S. **Obtenção de formulações ganêlicas contendo nano e microcapsulas de ácidos terpênicos**. Dissertação de Mestrado-2015. Instituto de Ciências da Saúde :Universidade Federal da Bahia Salvador, 2015.
- SARKHOT, D.V.; GRUNWALD, S.; GE, Y.; MORGAN, C.L.S., Comparison and detection of total and available soil carbon fractions using visible/near infrared diffuse reflectance spectroscopy. **Geoderma** v. 164, n. 22, p. 22–32, 2011.
- SAUTTER, C.K.; DENARDIN, S.; ALVES, A.O.; MALLMANN, C.A.; PENNA, N.G.; HECKTHEUER, L.H. Determinação de resveratrol em sucos de uva no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 3, p. 437-442, 2005.
- SCHER, S.L.; FUCHS, R. H.B.; DE SOUZA.G.T.; MARDIGAN, L.; KWIATKOWSKI, A. Compostos fenólicos de extrato de uva isabel e sua ação em bactérias ácido-láticas. **Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos**, Campo Mourão (PR), v. 1, n. 1, p. 35-37,2010.
- SHABIR, G. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. **Journal of Chromatography A**, v.987, n.1, p, 57-66, 2003.
- SHAH, A.A.; HASAN, F.; HAMEED, A.; AHMED, S. Biological degradation of plastics: A comprehensive review. **Biotechnol. Adv.**,Oxford, v.26, p. 246-265, 2008.
- SHAHIDI, F.; JANITHA, P.K.; WANASUNDARA, P.D. Phenolic antioxidants. CRC Critical Reviews in **Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v.32, n.1, p.67-103, 1992.
- SHARMA. A.; SHARMA, U, S Liposomes in drug delivery: progress and limitations. **.International Journal of Pharmaceutics**.v.154, n.2, p.123-140, 1997.

- SHEN, W.; YANG, D. & RYSER, H. J. P. Colorimetric determination of microgram quantities of polylysine by trypan blue precipitation. **Analytical Biochemistry**, v.2, n.1, p. 521–524, 1984.
- SHIM, J.; KANG, H. S.; PARK, W-S.; HAN, S-H.; KIM, J.; CHANG, I-S. Transdermal delivery of mixnoxidil with block copolymer nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 97, n.15, p. 477-484, 2004.
- SHIRAHIGUE, L. D. **Caracterização química dos extratos de semente e casca de uva e seus efeitos antioxidantes sobre carne de frango processada e armazenada sob refrigeração**. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo - ESALQ, Piracicaba, 2008
- SHRIKHANDE, A. J. Wine by-products with health benefits. **Food Research International**, v.16, n. 33, p. 469–474, 2000.
- SILVA, L.M.L.R. Caracterização dos subprodutos da vinificação. **Millenium, Viseu**, v.28, p.123-133, 2003.
- SILVA, S. G.; OLIVEIRA, P. V. & ROCHA, F. R. P. A green analytical procedure for determination of copper and iron in plant materials after cloud point extraction. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, n.21, v. 2, p.234-239, 2010.
- SILVA, S.; MATIAS, A.; NUNES, A. Identification of flavonol glycosides in winemaking by-products by HPLC with different detectors and hyphenated with mass spectrometry. **Ciência e Técnica Vitivinícola**, v. 20, n. 1, p. 17-33, 2005.
- SIMIC, M.G., JAVANOVIC, S.V. Inactivation of oxygen radicals by dietary phenolic compounds in anticarcinogenesis. *In*: HO, C.T., OSAWA, T., HUANG, T.M., ROSEN, R.T. (Ed.). Food phytochemicals for cancer prevention. Washington: **American Chemical Society**, n.546, p.20-33, 1994.
- SINGER, S. J.; NICOLSON, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science** n.175 p. 720-31, 1972.
- SKOOG, S.A.; WEST, D.M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S.R. Fundamentos de química analítica. 8. ed. Thompson Learning, 2006.
- SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v.15, p. 71-81, 2002.
- SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR., G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. de M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, p. 351-355, 2007.
- SOUZA, A. M. **Monitoração e ajuste de realimentação em processos produtivos multivariados**. Tese. Doutorado Engenharia de Produção – Universidade Federal de Santa Catarina, 2000.
- SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**. Nova Odessa, Instituto Plantarum. 217p. 2008.
- SUBBARAMAIAH, K.; CHUNG, W. J.; MICHALUART, P.; TELANG, N.; TANABE, T.; INOUE, H.; JANG, M.; PEZZUTO, J. M.; DANNENBERG, A. J. Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated human mammary epithelial cells. **Journal of Biological Chemistry** v. 273, n. 34, p. 21875-21882, 1998.
- TAYLOR, T. M.; DAVIDSON, P. M.; BRUCE, B. D.; WEISS, J. Liposomal nanocapsules in food science and agriculture. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 45, n.14, p. 587-605, 2005.
- TERRA, R.S.; MININ, M. M; CHORILLI, M. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade físico-química de formulação anticelulítica acrescida de lipossomas

- contendo sinefrina e cafeína. **Revista Brasileira de Farmácia** v. 90, n. 4, p. 303-308, 2009.
- TOMAZ, F.O.N. - **Estudo da evolução dos compostos da uva ao longo da maturação em clima semi-árido: castas Cabernet Sauvignon, Aragonez e Alicante Bouschet**. 2013.81 f. Dissertação (Mestrado)- Lisboa: ISA - Instituto Superior de Agronomia.
- TONIETTO, J. CAMARGO, U. A. **Vinhos tropicais no Brasil e no mundo**. Bon Vivant, Flores da Cunha, v.8, n.94, p.15, 2006.
- TRUEBA, G.P.; SÁNCHEZ, M. Los flavonóides como antioxidantes naturales. **Actafarmacéutica bonaerense**, v.20, n.20, p. 297-306, 2001.
- VARGAS, N. P.; HOELZEL, S.C; ROSA, C.S. Determinação do teor de polifenóis totais e atividade antioxidante em sucos de uva comerciais **Alimentos e Nutrição**. v.19, n.1, p. 11-15, 2008.
- VERMA, D. D.; VERMA, S.; BLUME, G.; FAHR, A. Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 258, n.24, p. 141-151, 2003.
- VICINI, L. **Análise multivariada da teoria à prática**. UFSM, CCNE, 2005. 215 p.
- VINADÉ, M. E. C.; VINADÉ, E. R. C., **Métodos espectroscópicos de análise quantitativa**. 1ª ed. UFSM. 2005. 272p.
- VOGT, E.; JAKOB, L.; LEMPERLE, E. **EL VINO: Obtención, elaboración y análisis**. Zaragoza (España): Editorial ACRIBIA, S. A. n. 13, p. 12-13, 1986.
- WATERHOUSE, A. L.; IGNELZI, S.; SHIRLEY, J. A comparison of methods for quantifying oligomeric proanthocyanidins from grape seed extracts. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 51, n.26, p. 383-389, 2002.
- WILLIMANN, H, WALDE, P, LUISI, P. L., GAZZANIGA, A., STROPPOLO, F. Lecithin organogel as matrix for transdermal transport of drugs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. Sep; n.9, v. 81, p.871-874, 1992.
- WOLD, S.; ESBENSEN, K.; GELADI, P. Principal Component Analysis. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v.2, n, 21. p. 37-52, 1987.
- WU, W.; MASSART, D. L.; DE JONG, S. The kernel PCA algorithms for wide data. Part I: Theory and algorithm. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems** v. 36, n.17, p. 165-172, 1997.
- XIA, E.; DENG, G. F.; GUO, Y. J.; LI, H. B. Biological activities of polyphenols from grapes. **International Journal of Molecular Sciences**, v.11, p. 622-46, 2010.
- XU, C.; ZHANG, Y.; CAO, L.; LUA, J. Phenolic compounds and antioxidant properties of different grape cultivars grown in China. **Food Chemistry**, v. 119, p.1557-1565, 2010.
- YEN, G.; WU, J. Antioxidant and radical scavenging properties of extracts from *Ganoderma tsugae*. **Food Chemistry** n.65, p. 375-379, 1999.
- YILMAZ, Y.; TOLEDO, R. T. Major flavonoids in grape seeds and skins: antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n.15, p. 255-260, 2004.
- ZAMORA, Fernando. **ELABORACIÓN Y CRIANZA DEL VINO TINTO: Aspectos científicos y prácticos**. 1.ed. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, 2003. 225p.
- ZHU, L.; ZHANG, Y.; JIANG, L. Phenolic contents and compositions in skins of red wine grape cultivars among various genetic backgrounds and originations. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n.16, p. 3492-3510, 2012.

ZUANAZZI, J. A.; MONTANHA, J. A. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5ed.
Porto Alegre – RS: Editora da UFSC, p. 577-604, 2004.