



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE

ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS**

**NANOENCAPSULAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DOS RESÍDUOS DA
VINIFICAÇÃO E SUA AVALIAÇÃO FÍSICA, QUÍMICA E BIOLÓGICA**

ROBERTO DÁVILA TRUJILLO

Orientador : Prof. Dra. MYRIAM M. SALAS MELLADO
Co-Orientador : Prof. Dr. CARLOS PRENTICE HERNÁNDEZ

Rio Grande, RS

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**NANOENCAPSULAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DOS RESÍDUOS DA
VINIFICAÇÃO E SUA AVALIAÇÃO FÍSICA, QUÍMICA E BIOLÓGICA**

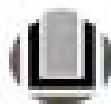
Roberto Dávila Trujillo

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos.

Orientador : Prof. Dra. MYRIAM M. SALAS MELLADO
Co-Orientador : Prof. Dr. CARLOS PRENTICE HERNÁNDEZ

Rio Grande, RS

2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS

ATA DO EXAME DE TESE Nº 05/2018

Às 14h30min do dia 12 de março de 2018 reuniu-se na Auditorio da EQA, a Comissão Examinadora de Tese de doutorado constituída para o exame da tese "NANOENCAPSULAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DOS RESÍDUOS DA VINIFICAÇÃO E SUA AVALIAÇÃO FÍSICA, QUÍMICA E BIOLÓGICA", do Engenheiro de Alimentos Roberto Dávila Trujillo, matrícula número 102357, tendo como orientadora a Profa. Dra. Myriam M. S. Mellado e como coorientador o Prof. Dr. Carlos Prentice. As argumentações apresentadas demonstraram que o discente tem domínio do conhecimento utilizado na sua tese. Portanto, a Comissão o considera APROVADO e APTO para receber o Título de DOUTOR em ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS e recomenda que esta ata acompanhe os documentos necessários para a emissão do título. O discente tem o prazo de 30 dias para a entrega da versão final da tese (cópias impressas e versão digitalizada) que passará pela avaliação de uma comissão do PPGECA e, após aprovação desta e a entrega da cópia do artigo aceito será solicitada a expedição do seu diploma.

Houve alteração do título () sim ☒ não. Se sim informar o título modificado:

Profa. Dra. Myriam de las Mercedes Sala Mellado - FURG

Profa. Dra. Eliana Badiale Furlong - FURG

Prof. Dr. Casiano Peláez Zapata Noreña - UFRGS

Profa. Dra. Cristiana Lima Dora - FURG

Dra. Michele Moraes de Souza - FURG

Dra. Meritane da Rocha - FURG

Roberto Dávila Trujillo

Ficha catalográfica

T866n Trujillo, Roberto Dávila.
 Nanoencapsulação de compostos fenólicos dos resíduos da
 vinificação e sua avaliação física, química e biológica / Roberto Dávila
 Trujillo. – 2018.
 241 p.

 Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande,
 Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos,
 Rio Grande/RS, 2018.
 Orientadora: Dra. Myriam De Las Mercedes Salas Mellado.
 Coorientador: Dr. Carlos Prentice Hernández.

 1. Resíduos da uva 2. Atividade antioxidante 3. Nanocápsulas
 4. *Caenorhabditis elegans* I. Mellado, Myriam De Las Mercedes Salas
 II. Hernández, Carlos Prentice III. Título.

CDU 664

AGRADECIMENTOS

Agradecer a Deus por ter me iluminado e me dado força para concluir mais essa etapa na minha vida.

Aos meus pais, Delia e Rosas pela vida. Em especial, estão constantemente presentes em minha vida. Obrigado pelo apoio, carinho, incentivo e amor.

Agradecer a Universidade Federal Agraria da Selva-UNAS-PERÚ, Faculdade de Engenharia de Industrias Alimentarias- FIIA, por me permitir conceder licença para realizar estudos de doutorado na FURG

Agradecer a Organização dos Estados Americanos-OEA, por me permitir vir ao BRASIL para realizar estudos de doutorado na FURG

Ao meus orientadores professores Dra Myriam Salas e o Dr. Carlos Prentice, pela amizade e apoio em todos esses anos. OBRIGADO pela oportunidade e paciência, ao longo do doutorado

Aos queridos colegas e amigos que comencaram o doutorado comigo na Escola de Química e Alimentos-FURG. Também por toda a amizade, apoio, paciência e carinho ao longo dos quatro anos de estudo.

À técnica de laboratorio Sabrine Aquino, por todos esses anos de convivência, ensinamentos e de muita paciência. Aos colegas e amigos do mestrado e doutorado do Laboratório de Tecnologia de Alimentos que me proporcionaram momentos de muito conhecimento e alegria.

A todos os professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, pelos anos de ensinamentos e convivência.

Ao pessoal do laboratorio de Bioquímica Animal Funcional de Organismos Aquáticos (BIFOA)-CIB-FURG, dirigido pelo professor Dr. José María Monserrat e ao doutorando Marcelo Estrella Josende, pela ajuda com a análise em *C. elegans*.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da Região Sul (CEME-Sul), pela disponibilização dos

equipamentos para a realização das análises de Microscopia Eletrônica de Varredura.

À Universidade Federal do Rio Grande, por me proporcionar todos esses anos de crescimento e conhecimento.

RESUMO

O objetivo geral do presente estudo foi utilizar os resíduos da vinificação em suas variedades Merlot, Shiraz, Pinot Noir e Cabernet Sauvignon, para a extração, nanoencapsulação de compostos fenólicos, e a avaliação de sua bioatividade “*in vitro*” e “*in vivo*” sobre *Caenorhabditis elegans*. A biomassa foi caracterizada pelas análises físico-química, fenólica e de atividade antioxidante. Depois realizou-se o estudo da extração de compostos fenólicos utilizando solventes (etanol, metanol, acetona e a enzima celulase) e nos extratos determinou-se trans-resveratrol por cromatografia líquida de alta eficácia. Dos melhores resíduos da extração foram formulados diferentes nanopartículas por atomização, liofilização e emulsão de baixa energia. Nas nanopartículas foram avaliadas o conteúdo de compostos fenólicos, o índice de polidispersão, potencial zeta e térmica, in-vitro da atividade antioxidante e digestão gastro-intestinal simulada, avaliação in-vivo do efeito sobre o estresse oxidativo e longevidade em nematóide de *Caenorhabditis elegans*. Os resíduos apresentaram um pH ótimo para sua conservação como biomassa, elevado conteúdo de fibra, o conteúdo de proteínas foi proveniente provavelmente da fertilização dos cultivos da uva e da vinificação. O conteúdo mais alto de antocianinas foi da variedade Merlot com $118,93 \pm 0,65$ (mg malvidin-3-glicosídeo/100g m.s. de resíduos). O resíduo Merlot foi o que teve o teor mais alto de compostos fenólicos igual a $3902,54 \pm 8,22$ (mg de ácido gálico/100g de m.s.). A variedade Shiraz apresentou o teor mais alto de flavonóides totais equivalente a $26,56 \pm 0,15$ (mg quercetina/100g de m.s.) e o resíduo Merlot apresentou uma maior capacidade antioxidante. Do estudo dos métodos de extração, o extrato de Cabernet Sauvignon apresentou maior conteúdo de antocianinas e o extrato Merlot de fenólicos totais ($1601,1$ mg mv-3-glc/100g e $9366,4$ mg ácido gálico/100g de extrato b.s.), respectivamente. O maior conteúdo de flavonóides totais foi do extrato Shiraz ($192,2$ mg quercetina/100g de extrato), o extrato Merlot teve a maior atividade antioxidante pelos métodos de captura de radicais livres 1,1-difenil-2-picrilhidrazil e 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido-sulfônico) ($5057,3$ e $4986,2$ mg equivalente de trolox/100g b.s.). Da formulação e elaboração das nanopartículas, sobre suas propriedades físicas e químicas, ficaram como os melhores tratamentos T₂ (com extrato Shiraz, maltodextrina e atomização) e T₉ (com extrato Merlot, maltodextrina e atomização), que foram identificadas como nanoesferas. Da digestão gastrointestinal determinou-se que as nanoesferas têm proteção contra a liberação dos compostos fenólicos e da atividade antioxidante na boca, estômago e intestino. Dos efeitos biológicos “*In vivo*” determinou-se que as nanoesferas T₂ nas concentrações de 50, 100 e 150 mg/mL, atuaram como pro-oxidantes, não tiveram resistência ao estresse oxidativo e a longevidade permaneceu abaixo do controle, devido as altas concentrações de antioxidantes. Em geral, o resíduo de uva da variedade Merlot foi o que apresentou o valor mais elevado de antocianinas totais. O extrato do resíduo da variedade Shiraz apresentou o conteúdo mais alto de compostos fenólicos totais, atividade antioxidante e *trans*-resveratrol ($3,7$ mg resveratrol/100 g). Portanto o tratamento T₉ foi o que apresentou alta resistência ao estresse oxidativo e uma alta longevidade, com uma sobrevivência máxima de 37 dias e um 27,03% de redução de sobrevivência media do *Caenorhabditis elegans*.

Palavras-chave: Resíduos de uva. Atividade antioxidante. Nanocápsulas. *Caenorhabditis elegans*.

NANOENCAPULATION OF PHENOLIC COMPOUNDS OF VINIFICATION RESIDUES AND THEIR PHYSICAL, CHEMICAL AND BIOLOGICAL EVALUATION

ABSTRACT

The general objective of the present study was to use the vinification residues in its Merlot, Shiraz, Pinot Noir and Cabernet Sauvignon varieties for the extraction, nanoencapsulation of phenolic compounds, and the evaluation of their *in vitro* and *in vivo* bioactivity on *Caenorhabditis elegans*. Biomass was characterized by physicochemical, phenolic and antioxidant activity analyzes. Then, the extraction of phenolic compounds was carried out using solvents (ethanol, methanol, acetone and cellulase enzyme) and in the extracts trans-resveratrol was determined by high performance liquid chromatography. Of the best extraction wastes different nanoparticles were formulated by atomization, lyophilization and low energy emulsion. The content of phenolic compounds, the polydispersity index, zeta and thermal potential, *in-vitro* antioxidant activity and simulated gastro-intestinal digestion, *in-vivo* evaluation of the effect on oxidative stress and longevity in *Caenorhabditis elegans* nematode were evaluated in the nanoparticles. The residues presented an optimum pH for their conservation as biomass, high fiber content, the protein content probably came from the fertilization of grape crops and vinification. The highest content of anthocyanins was of the Merlot variety with 118,93 (mg malvidin-3-glycoside/100 g of m.s.). Of the total phenolic compounds, the Merlot residue had the highest content equal to 3902,54 (mg of gallic acid/100 g of m.s.). The Shiraz variety had the highest total flavonoid content equivalent to 26,56 (mg quercetin/100 g m.s.) and the Merlot residue had a higher antioxidant capacity. From the study of the extraction methods, the extract of Cabernet Sauvignon presented higher content of anthocyanins and the Merlot extract of total phenolics (1601,1 mg mv-3-glc/100 g and 9366,4 mg gallic acid/100 g of bs extract), respectively. The highest total flavonoid content was from the Shiraz extract (192.2 mg quercetin/100 g extract), the Merlot extract had the highest antioxidant activity by the free radical capture methods 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl and 2,2 azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (5057.3 and 4986.2 mg trolox equivalent/100 g bs). From the formulation and elaboration of the nanoparticles, on their physical and chemical properties, they were the best T₂ treatments (with Shiraz extract, maltodextrin and atomization) and T₉ (with Merlot extract, maltodextrin and atomization), which were identified as nanospheres. From gastrointestinal digestion it was determined that nanospheres have protection against the release of phenolic compounds and antioxidant activity in the mouth, stomach and intestine. From the biological effects "*In vivo*", T₂ nanospheres at concentrations of 50, 100 and 150 mg/mL were determined to act as pro-oxidants, had no resistance to oxidative stress and longevity remained below control due to high concentrations of antioxidants. In general, the grape residue of the Merlot variety was the one with the highest value of total anthocyanins. The extract of the Shiraz residue showed the highest content of total phenolic compounds, antioxidant activity and trans-resveratrol (3.7 mg resveratrol/100 g). Therefore, T₉ treatment showed high resistance to oxidative stress and high longevity, with a maximum survival of 37 days and a 27.03% reduction in mean survival of *Caenorhabditis elegans*.

Keywords: Grape residues. Antioxidant activity. Nanocapsules. *Caenorhabditis elegans*.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II – REVISÃO DA LITERATURA

Tabela 1 - Composição Centesimal da uva patricia (<i>Vitis labrusca</i> L.).....	38
Tabela 2 - Produção de vinho em milhões de hectolitros (MhL)	41
Tabela 3 - Composição parcial do bagaço, semente e casca de uva (base seca).....	42
Tabela 4 – Teor fenólicos determinados em metanol e acetona (cascas e semente) (TP: fenóis totais, TF: flavonóides totais, TA: antocianinas totais, TC: catequinas totais).....	50
Tabela 5 - Extratos e compostos fenólicos produzidos por cultura de tecidos vegetais	50
Tabela 6 - Métodos utilizados na elaboração de micro e nanopartículas.....	52
Tabela 7 - Principais agentes carreadores em alimentos.....	55
Tabela 8 - Características dos amidos e seus hidrolisados, de acordo com sua DE.....	57

CAPÍTULO III – DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

ARTIGO I - Caracterização física-química, fenólica e atividade antioxidante de diferentes resíduos da vinificação (*Vitis vinifera* L.).

Tabela 1 - Teores de pH, sólidos solúveis e acidez total nos resíduos de diferentes variedades de uva procedentes da vinificação.....	96
Tabela 2 - Teores de umidade, cinzas, lipídios e nitrogênio nos resíduos de diferentes variedades de uva procedentes da vinificação, base seca.	99
Tabela 3 - Conteúdo de antocianinas totais (AT), fenólicos totais (FT) e flavonóides totais (FVT) nos resíduos de diferentes variedades de uvas tintas (<i>Vitis vinifera</i> L.), procedentes da vinificação.	101
Tabela 4- Capacidade antioxidante pelos métodos de DPPH, ABTS e poder redutor nos resíduos de diferentes variedades de uva procedentes da vinificação.	104
Tabela 5 - Parâmetros de cor nos resíduos de diferentes variedades de uva procedentes da vinificação.	107

ARTIGO II - Estudo da extração de fenólicos e *trans*-resveratrol, e avaliação da atividade antioxidante dos extratos dos resíduos da vinificação.

Tabela 1 - Esquema experimental para a extração dos compostos fenólicos e resveratrol.....	120
--	-----

Tabela 2 - Conteúdo de antocianinas totais (AT) nos extratos dos resíduos procedentes da vinificação de diferentes variedades de uvas (<i>Vitis vinifera</i> L.).....	127
Tabela 3 - Conteúdo de fenólicos totais (FT) nos extratos dos resíduos procedentes da vinificação de diferentes variedades de uvas (<i>Vitis vinifera</i> L.).....	129
Tabela 4 - Conteúdo de flavonóides totais (FVT) nos extratos dos resíduos procedentes da vinificação de diferentes variedades de uvas (<i>Vitis vinifera</i> L.).....	130
Tabela 5 - Atividade antioxidante pelo método DPPH nos extratos de resíduos procedentes da vinificação de diferentes variedades de uvas (<i>Vitis vinifera</i> L.).....	132
Tabela 6 - Atividade antioxidante pelo método ABTS nos extratos de resíduos procedentes da vinificação de diferentes variedades de uvas (<i>Vitis vinifera</i> L.).....	133
Tabela 7 - Atividade antioxidante pelo método do Poder redutor nos extratos de resíduos procedentes da vinificação de diferentes variedades de uvas tintas (<i>Vitis vinifera</i> L.).....	134
Tabela 8 - Parâmetros de cor nos resíduos da vinificação de diferentes variedades de uva.....	136
Tabela 9 – Conteúdo de <i>trans</i> -resveratrol nos extratos metanólicos dos resíduos da Vinificação de diferentes variedades de uvas tintas (<i>Vitis vinifera</i> L.).....	138

ARTIGO III - Avaliação física, química e biológica de nanopartículas de extratos fenólicos de resíduos da vinificação.

Tabela 1 - Formulação das nanopartículas contendo extratos fenólicos de extratos dos resíduos da vinificação.....	153
Tabela 2 - Composição de antocianinas, fenólicos e flavonóides totais apresentada pelas nanopartículas dos extratos de resíduos da vinificação.....	166
Tabela 3 - Atividade antioxidante das nanopartículas dos extratos de resíduos da vinificação.....	168
Tabela 4 - Tamanho de partículas, índice de polidispersão e Potencial Zeta das nanopartículas dos extratos de resíduos da vinificação.....	170
Tabela 5 - Propriedades físicas das nanoesferas dos extratos de resíduos da vinificação.....	175
Tabela 6 - Rendimento da encapsulação das nanocápsulas em função dos compostos fenólicos e atividade antioxidante.....	182
Tabela 7 - Efeito das nanoesferas sobre a longevidade do <i>C. elegans</i> tipo selvagem	192

ANEXO I

Tabela 1 - Valores de digestão <i>in vitro</i> das nanoesferas com relação a compostos fenólicos e capacidade antioxidante dos extratos de resíduos da vinificação.....	237
---	-----

ANEXO II

Tabela 1 - Dados experimentais para construir a curva padrão dos fenólicos totais..... 238

Tabela 2 - Dados experimentais para construir a curva padrão dos flavonóides totais..... 238

ANEXO III

Tabela 1 – Dados experimentais para construir a curva padrão da atividade antioxidante pelo método DPPH..... 239

Tabela 2 - Dados experimentais para construir a curva padrão da atividade antioxidante pelo método ABTS..... 239

Tabela 3 - Dados experimentais para construir a curva padrão do resveratrol..... 239

ANEXO IV

Tabela 1 - Dados experimentais da fluorescência líquida nos *C. elegans*..... 240

Tabela 2 – Proporções de sobrevivência dos *C. elegans*..... 241

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II – REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1 - Componentes gerais de uma baga de uva	38
Figura 2 - Cachos das uvas Cabernet sauvignon (a), Merlot (b), Pinot Noir (c) e Shiraz (d)...	40
Figura 3 - Resíduos da indústria vinícola.....	43
Figura 4 - Morfologia de diferentes células de uva.....	43
Figura 5 - Sementes da indústria vinícola.....	44
Figura 6 - Polifenóis em bagas de uva	45
Figura 7 - Isômeros do resveratrol, (A) <i>trans</i> -resveratrol (B) <i>cis</i> -resveratrol.....	46
Figura 8 - Estrutura de um fenol	47
Figura 9 - Estrutura básica dos flavonóides.....	47
Figura 10 - Classificação de polifenóis	48
Figura 11 - Representação esquemática de nanopartículas	51
Figura 12 - Esquematização das etapas envolvidas no processo de encapsulação por spray drying	53
Figura 13 - Diagrama de fases da água.....	54
Figura 14 - Estrutura química da maltodextrina.....	56
Figura 15 - Estrutura química da goma arábica	58
Figura 16 - Larva de <i>C. elegans</i> adulto	65
Figura 17 - Anatomia do <i>C. elegans</i> (Na parte superior esquerda, imagem de microscópio de luz de <i>C. elegans</i> . Abaixo, uma representação esquemática da anatomia de <i>C. elegans</i> monstrando as partes de interesse para a avaliação de Nanopartículas)	66
Figura 18 - Ciclo de vida do <i>C. Elegans</i>	68

CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

ARTIGO I - Caracterização física-química, fenólica e atividade antioxidante de diferentes resíduos da vinificação (*Vitis vinifera* L.)

Figura 1 - Resíduos de uva tintas (<i>Vitis vinifera</i> L.). (A) Merlot; (B) Cabernet Sauvignon; (C) Pinot Noir; (D) Shiraz.....	88
Figura 2 - Curva padrão de fenólicos totais.....	91
Figura 3 - Curva padrão de flavonóides totais.....	92
Figura 4 - Curva padrão do Trolox, para determinar atividade antioxidante pelo	

Método DPPH.....	93
Figura 5 - Curva padrão do Trolox para determinar atividade antioxidante pelo método ABTS.....	94
Figura 6 - Teores de pH, sólidos solúveis e acidez total nos resíduos de diferentes variedades de uva procedentes da vinificação.	97
Figura 7 - Composição química e valor calórico dos resíduos de diferentes variedades de uva procedentes da vinificação.....	100
Figura 8 - Teores de antocianinas totais (AT), fenólicos totais (FT) e flavonóides totais (FVT) nos resíduos de diferentes variedades de uva procedentes da vinificação.....	103
Figura 9 - Capacidade antioxidante por método de DPPH, ABTS (mg eq-trolox/100 g b.s.) e do poder redutor (Absorbância) nos resíduos de uva procedentes da vinificação.....	105
Figura 10 - Parâmetros de cor nos resíduos de diferentes variedades de uva procedentes da vinificação.....	107

ARTIGO II - Estudo da extração de fenólicos e *trans*-resveratrol, e avaliação da atividade antioxidante dos extratos dos resíduos da vinificação.

Figura 1 - Cromatograma-HPLC do <i>trans</i> -resveratrol para os extratos metanolicos dos resíduos da vinificação (a) Resveratrol standard (b) Shiraz (c) Pinot Noir (d) Merlot (e) Cabernet Sauvignon.....	137
--	-----

ARTIGO III - Avaliação física, química e biológica de nanopartículas de extratos fenólicos de resíduos da vinificação

Figura 1 - Modelo biológico do sistema gastrointestinal em seres humanos.....	162
Figura 2 - Índice de polidispersão das nanoesferas. A) Extrato de Shiraz, maltodextrina e atomização (T ₂) e B) Extrato de Merlot, maltodextrina e atomização (T ₉).....	172
Figura 3 - Morfologia das nanopartículas encapsuladas.....	174
Figura 4 - Termograma das nanoesferas T ₂ (Shiraz) e T ₉ (Merlot) dos extratos de vinificação.....	180
Figura 5 - Comparação da liberação durante a digestão gastrointestinal de compostos fenólicos (A), flavonóides (B), Resveratrol (C) e atividade antioxidante por DPPH (D), por ABTS (E) e por poder redutor (F) das das nanocápsulas T ₂ (Shiraz) e T ₉ (Merlot).....	185
Figura 6 - Avaliação in vivo da redução do estresse oxidativo (Ros-DCFDA) em <i>C. elegans</i> frente as nanoesferas dos resíduos da vinificação.....	188

Figura 7 - Nematóide adulto-L4, sometidos as nanoesferas T₉ na concentração de 50 (mg/mL) com 37 dias de vida (A), Nematóide controle L₁ (B), Nematóides sincronizados (C) 190

Figura 8 - Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier dos nematóides *C. elegans* do tipo selvagem (N2), tratados com nanoesferas dos resíduos da vinificação. T₂ (Shiraz) e T₉ (Merlot), em diferentes concentrações..... 191

NOMENCLATURA

A - Absorbância

ABTS - Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)

AD - Água desionizada

AlCl₃ - Cloreto de alumínio

ANOVA - Análise de variância

AOAC - Association of Official Analytical Chemistry

AT – Antocianinas totais

ATT - Acidez total titulável

Be – Baixa energia

C* - Cromaticidade

CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência

DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazila

DSC - Calorimetria Diferencial de Varredura

DCFH-DA - 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate

EAG – Equivalente de ácido gálico

EROs - Espécies reativas de oxigênio

ExM – Extrato Merlot

ExS – Extrato Shiraz

FD – Fator de diluição

FT – Fenólicos totais

FVT – Flavonóides totais

GA – Goma arábica

H° - Ângulo Hue

Kcal - Kilo calorias

KD – Kilo dalton

LTA - Laboratório de Tecnologia de Alimentos

M - Molaridade

MD - Maltodextrina

MEV - Microscopia eletrônica de Varredura

MG - Miligramas

MhL - Milhões de hectolitros

MM - Massa molecular

M.S. – Materia seca

Na₂CO₃ – Carbonato de sódio

NaNO₂ - Nitrito de sódio

NaOH - Hidróxido de sódio

NM - Nanômetro

OS – Oleo de soja

PDI - Índice de polidispersão

Pz - Pontencial zeta

QE - Quercetina

RS – Rio Grande do Sul

ROS - Espécies reativas de oxigênio

SST - Sólidos solúveis totais

TCA - Ácido tricloroacético

TEAC - Atividade antioxidante equivalente ao Trolox

Tween 80 - Polisorbato

TROLOX - 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	29
INTRODUÇÃO GERAL.....	29
OBJETIVOS.....	29
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	31
2 OBJETIVOS.....	33
2.1 OBJETIVO GERAL.....	33
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
CAPÍTULO II	35
REVISÃO DE LITERATURA	35
2.1 UVA	37
2.1.1 Cabernet Sauvignon.....	39
2.1.2 Merlot.....	39
2.1.3 Pinot Noir.....	39
2.1.4 Shiraz	40
2.2 PRODUÇÕES DE VINHO NO MUNDO E NO BRASIL.....	40
2.3 RESÍDUOS DA INDÚSTRIA VINÍCOLA	42
2.3.1 Bagaço de uva	42
2.3.2 Casca de uva	43
2.3.3 Sementes de uva	44
2.3.4 Compostos fenólicos dos resíduos da vinificação	45
2.3.5 Resveratrol da uva	46
2.3.6 Atividade antioxidante dos compostos fenólicos	46
2.3.7 Trabalhos sobre a atividade antioxidante em resíduos da vinificação.....	48
2.4 METODOS DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS	49
2.5 NANOENCAPSULAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS	51
2.5.1 Metodos de encapsulamento.....	52
2.5.1.1 Spray drying	53
2.5.1.2 Liofilização.....	53
2.5.1.3 Emulsificação.....	54
2.5.2 Materiais de parede.....	55
2.5.2.1 Maltodextrina	56

2.5.2.2 Goma arábica	57
2.6 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE MICRO E NANOPARTÍCULAS	58
2.6.1 Análise termogravimétrica	59
2.6.2 Análise morfológica das nanopartículas	60
2.6.2.1 Microscopia eletrônica de varredura - MEV.....	60
2.6.3 Tamanho e distribuição de partículas.....	61
2.6.4 Potencial zeta.....	62
2.7 AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA DIGESTÃO GASTROINTESTINAL	62
2.7.1 Digestão gastrointestinal das nanopartículas	62
2.8 <i>CAENORHABDITIS ELEGANS</i>	64
2.8.1 Características	64
2.8.2 Sexo.....	65
2.8.3 Anatomia.....	65
2.8.3.1 Cutícula e epiderme.....	66
2.8.3.2 Sistema alimentar	67
2.8.4 Sistema modelo <i>Caenorhabditis elegans</i> para pesquisas	67
2.8.5 Avaliação da teoria do estresse oxidativo em <i>C. elegans</i>	69
2.8.6 Trabalhos sobre avaliação do estresse oxidativo e longevidade em <i>C. elegans</i>	70
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO.....	79
APRESENTAÇÃO.....	81
ARTIGO I	83
CARACTERIZAÇÃO FÍSICA-QUÍMICA, FENÓLICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE DIFERENTES RESÍDUOS DA VINIFICAÇÃO (<i>Vitis vinifera</i> L.)	83
RESUMO	85
1 INTRODUÇÃO	86
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	88
2.1 REAGENTES.....	88
2.2 AMOSTRAS.....	88
2.3 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	88
2.4 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DOS RESÍDUOS.....	89
2.5 COMPOSIÇÃO QUÍMICA PROXIMAL.....	89
2.6 DETERMINAÇÃO DE ANTOCIANINAS TOTAIS.....	89

2.7 DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS.....	90
2.7.1 Curva de calibração dos fenólicos totais.....	90
2.8 DETERMINAÇÃO DE FLAVONÓIDES TOTAIS.....	91
2.8.1 Curva de calibração dos flavonóides totais.....	91
2.9 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE – MÉTODO DPPH.....	92
2.9.1 Curva de calibração para o método do DPPH.....	93
2.10 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE – MÉTODO ABTS.....	93
2.10.1 Curva de calibração para o método ABTS.....	94
2.11 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE - MÉTODO DO PODER REDUTOR.....	95
2.12 DETERMINAÇÃO DA COR.....	95
2.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	95
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	95
3.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS NOS RESÍDUOS DE DIFERENTES VARIEDADES DE UVA PROCEDENTES DA VINIFICAÇÃO.....	95
3.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA PROXIMAL NOS RESÍDUOS DE DIFERENTES	
VARIEDADES DE UVA PROCEDENTES DA VINIFICAÇÃO.....	97
3.3 FENÓLICOS TOTAIS, FLAVONÓIDES TOTAIS E ANTOCIANINAS.....	100
3.4 ANÁLISE DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE - MÉTODO DPPH.....	104
3.5 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE - MÉTODO ABTS.....	105
3.6 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE – PODER REDUTOR.....	106
3.7 ANÁLISE DE COR.....	106
4 CONCLUSÃO.....	108
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109
ARTIGO II	115
ESTUDO DA EXTRAÇÃO DE FENÓLICOS E <i>TRANS</i> -RESVERATROL, E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE RESÍDUOS DA VINIFICAÇÃO	115
RESUMO.....	117
1 INTRODUÇÃO.....	118
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	120
2.1 REAGENTES	120
2.2 AMOSTRAS.....	120

2.3 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS	120
2.3.1 Extração etanólica (70%) acidificada (T ₁)	121
2.3.2 Extração com acetona (70%) acidificada (T ₂)	121
2.3.3 Extração etanol-acetona acidificada, mistura tipo I (T ₃)	121
2.3.4 Extração etanol-acetona (70%) acidificada, mistura tipo II (T ₄)	121
2.3.5 Extração metanólica (T ₅)	122
2.3.6 Extração enzimática (T ₆)	122
2.3.7 Extração etanolica-enzimática (T ₇)	122
2.4 DETERMINAÇÃO DE ANTOCIANINAS TOTAIS	123
2.5 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS	123
2.6 DETERMINAÇÃO DE FLAVONOIDES TOTAIS	124
2.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE – MÉTODO DPPH	124
2.8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE – MÉTODO ABTS	125
2.9 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE - MÉTODO DO PODER REDUTOR	125
2.10 ANÁLISES DO <i>TRANS</i> -RESVERATROL POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUÇÃO	126
2.11 DETERMINAÇÃO DA COR	126
2.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA	127
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	127
3.1 ANTOCIANINAS TOTAIS	127
3.2 FENÓLICOS TOTAIS	128
3.3 FLAVONÓIDES TOTAIS	129
3.4 ANÁLISE DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE - MÉTODO DPPH	131
3.5 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE - MÉTODO ABTS	132
3.6 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE – PODER REDUTOR	133
3.7 ANÁLISE DE COR	135
3.8 <i>TRANS</i> -RESVERATROL	136
4 CONCLUSÕES	139
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	139
ARTIGO III	145
AVALIAÇÃO FÍSICA, QUÍMICA E BIOLÓGICA DE NANOPARTÍCULAS DE EXTRATOS FENÓLICOS DE RESÍDUOS DA VINIFICAÇÃO	145

RESUMO.....	147
1 INTRODUÇÃO.....	148
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	151
2.1 REAGENTES E MATERIAIS	151
2.2 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA E DOS EXTRATOS DE COMPOSTOS FENÓLICOS.....	151
2.3 FORMULAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS.....	152
2.3.1 Preparação das nanopartículas por secado de atomização e liofilização	152
2.3.2 Preparação de nanocápsulas por emulsão de baixa energia.....	153
2.4 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO TOTAL DE ANTOCIANINAS, COMPOSTOS FENÓLICOS, FLAVONÓIDES E <i>TRANS</i> -RESVERATROL.....	154
2.4.1 Determinação de antocianinas totais.....	154
2.4.2 Determinação de compostos fenólicos totais.....	154
2.4.3 Determinação de flavonóides totais.....	155
2.4.4 Análises do <i>Trans</i> -resveratrol por cromatografia líquida de alta resolução.....	155
2.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE “ <i>In-vitro</i> ”	156
2.5.1 Determinação da atividade antioxidante – Método DPPH.....	156
2.5.2 Determinação da atividade antioxidante – Método ABTS.....	157
2.5.3 Determinação da atividade antioxidante - Método do poder redutor.....	157
2.6 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS.....	158
2.6.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	158
2.6.2 Tamanho de partículas, índice de polidispersão e potencial zeta.....	158
2.6.3 Umidade.	158
2.6.4 Atividade de água.....	158
2.6.5 Higroscopicidade.....	159
2.6.6 Solubilidade.....	159
2.6.7 Grau de aglomeração.....	159
2.6.8 Molhabilidade	160
2.6.9 Temperatura de transición vítrea (Tg) e Análise de calorimetria diferencial de varredura (DSC).....	160
2.6.10 Determinação do Cor.....	160
2.7 RENDIMENTO DE ENCAPSULAÇÃO	161
2.8 DIGESTÃO GASTRO-INTESTINAL <i>IN-VITRO</i>	161

2.9 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO E LONGEVIDADE <i>IN-VIVO</i> COM <i>CAENORHABDITIS ELEGANS</i>	162
2.9.1 Cepas do modelo <i>in vivo</i> <i>C. elegans</i> , cultivo e sincronização.....	162
2.9.2 Tempo de vida dos <i>C. elegans</i>	163
2.9.3 Estresse oxidativo em <i>C. elegans</i>	164
2.9.4 Longevidade em <i>C. elegans</i>	164
2.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	165
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	165
3.1 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO TOTAL DE ANTOCIANINAS, FENÓLICOS E FLAVONÓIDES.....	165
3.2 AVALIAÇÃO <i>IN-VITRO</i> DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	167
3.3 ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO E POTENCIAL ZETA.....	169
3.4 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS NANOPARTÍCULAS POR MEV.....	173
3.5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DAS NANOESFERAS	175
3.5.1 Umidade.....	175
3.5.2 Atividade de água.....	176
3.5.3 Solubilidade.....	176
3.5.4 Higroscopicidade.....	177
3.5.5 Grau de aglomeração.....	177
3.5.6 Molhabilidade.....	178
3.5.7 Cor (a*, b*, L*, H, C)	178
3.5.8 Análise de calorimetria diferencial de varredura (DSC).....	179
3.6 RENDIMENTO DA NANOENCAPSULAÇÃO.....	182
3.7 AVALIAÇÃO DA DIGESTÃO GASTRO-INTESTINAL “ <i>IN-VITRO</i> ”	183
3.8 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO E LONGEVIDADE EM <i>IN-VIVO</i> COM <i>C. elegans</i>	187
3.8.1 Estresse oxidativo em <i>C. elegans</i>	188
3.8.2 Longevidade em <i>C. elegans</i>	190
4 CONCLUSÕES.....	193
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	195
CAPÍTULO IV – CONCLUSÕES.....	207
CAPÍTULO V – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	211
ANEXO I.....	237

ANEXO II.....	238
ANEXO III.....	239
ANEXO IV.....	240

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

OBJETIVOS

1 INTRODUÇÃO GERAL

Brasil é um país de alta atividade agrícola e grande produtor de resíduos agroindustriais, especialmente da uva, sendo o estado de Rio Grande do Sul o maior produtor onde são industrializadas 188,5 mil toneladas de uva e 300 milhões de litros de vinho e mosto por ano. No processamento geram-se resíduos formados por casca e sementes, perto de 134 mil toneladas anualmente (CAMPOS, 2005; GOMEZ-PLAZA et al., 2006; CATANEO et al., 2008; ROCKENBACH et al., 2011a). Estes resíduos contêm grandes quantidades de fenólicos, antioxidantes, corantes, e outros compostos com altas atividades funcionais, que permanecem nele depois da elaboração do vinho, (BALASUNDRAM et al., 2006; CAMPOS, 2005; FERREIRA, 2010). Os resíduos da vinificação são uma fonte barata e natural de fitoquímicos e antioxidantes, sendo que para sua extração são utilizadas metodos de extração sólido-líquido mediante solventes de alta polaridade como o metanol, etanol e acetona, aplicados com pequena variação de pH e temperatura (MANTELL et al., 2002; PINELO et al., 2005; CISSÉ et al., 2012; CACACE et al., 2003). Recentes estudos identificaram e quantificaram a presença dos derivados do ácido hidroxicinâmico, como os ácidos, ferúlico, cafeico e cumárico; flavonóis e as proantocianidinas (ANASTASIADI et al., 2010; AMICO et al., 2008; PASSOS et al., 2007; FLAMINI, 2003; GABETTA et al., 2000; HAYASAKA et al., 2003; GONZÁLEZ-PARAMÁS et al., 2004). Esta demonstrado *in-vitro* e *in-vivo* que as moléculas fenólicas possuem propriedades antioxidantes, atuando fisiologicamente para reduzir o risco de doenças nos seres humanos e que ainda não são aproveitados como sub produtos da nanoencapsulação (ARVANITOYANNIS et al., 2006; FONTANA et al., 2013; TSENG-ZHAO, 2013).

A encapsulação é usada para manter a estabilidade das moléculas fenólicas e pode-se realizar com tecnologias de nanoencapsulação para obter nanopartículas e proteger das condições ambientais adversas (POURASHOURI et al., 2014). A nanoencapsulação é a formação de partículas com tamanho nanométrico (1-200 nm) (SINGH et al., 2014; RATHORE et al., 2013; SOUZA et al., 2014). Esta tecnologia é um processo no qual uma molécula ativa está revestido por um polímero, até que ela seja liberada, pode ser de origem natural, sintética ou semi-sintética (AZEREDO, 2005; PORRARUD-PRANEE, 2010; DE BARROS FERNANDES et al., 2014). Os polímeros podem ser de maltodextrina e goma arábica, os polímeros de maltodextrinas $[(C_6H_{12}O_5)_nH_2O]$ com graus de dextrose equivalente (DE) entre 10 e 20 são amplamente utilizados no encapsulamento (BAKOWSKA-

BARCZAK; KOŁODZIEJCZYK, 2011; ERSUS; YURDAGEL, 2007; TONON; BRABET; HUBINGER, 2010). O polímero de goma arábica é um heteropolissacarido de alta massa molecular formada por uma cadeia linear de D-galactosa unidas por enlaces β -1,4 e β -1,6, apresentam caráter anfifílico o que lhes permite atuar como encapsulantes (AHMED et al., 2005; RASCON et al., 2011).

As técnicas utilizadas na presente pesquisa foram atomização, Liofilização e Nanoemulsão de baixa energia (SCHMITZ-SCHUG et al., 2016; JYOTHI et al., 2010; ESTEVINHO et al., 2013; SHOFINITA; LANGRISH, 2014; PHISUT, 2012). A digestão gastrointestinal das nanocápsulas é um processo complexo, importante pela liberação do núcleo para ser absorvidas na corrente sanguínea. O processo inicia na boca (pH:7) com tempo de 15 minutos a 3 horas. Depois passa ao estômago (pH:3) com tempo de 15 minutos a 3 horas em um meio que contém HCL, pepsina e lipase gástrica. Depois continua no intestino para quebrar as moléculas e absorver os nutrientes (pH: 7) com tempo de 2-5 horas em um meio de suco pancreático, bile e NaHCO_3 (KONG; SINGH, 2008; WODA et al., 2010). (GUERRA et al., 2012; PINHEIRO, 2013).

Para avaliar o efeito biológico das nanocápsulas utilizou-se o nematóide *Caenorhabditis elegans* que é um organismo bem caracterizado, sendo que 60 a 80% dos genes humanos possuem homólogos como o *C. elegans*, apresentam tempo de vida de aproximadamente três semanas. Devido a sua pequena dimensão, permite-se a realização de ensaios em placas de poliestireno e por ser um nematóide transparente com marcadores fluorescentes, permite que as respostas ao estresse e longevidade sejam facilmente investigadas “*in vivo*” (GAMI; WOLKOW, 2006; KALETTA; HENGARTNER, 2006). (AVILA et al., 2012). Em muitos trabalhos utilizaram-se os *C. elegans* para avaliar o efeito das moléculas fenólicas procedentes dos vegetais sobre a resistência ao estresse oxidativo e a longevidade nos organismos vivos. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi caracterizar o extrato fenólico e nanoencapsular os compostos fenólicos dos resíduos da vinificação (*Vitis vinífera* L.), avaliar a atividade antioxidante e a digestão gastro-Intestinal simulada na Boca-Estômago-Intestino “*in-vitro*”, avaliar o efeito das nanoesferas sobre o estresse oxidativo e longevidade “*in-vivo*” em *Caenorhabditis elegans*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Utilizar os resíduos da uva preta (*Vitis vinífera*) procedentes da vinificação para a extração e nanoencapsulação de compostos fenólicos, e a avaliação da atividade antioxidante, física, química e biológica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar físico-quimicamente, determinando o conteúdo de antocianinas, fenólicos totais, flavonóides totais e a atividade antioxidante presentes nos resíduos da uva (*Vitis vinífera*) provenientes da vinificação.
- Determinar o melhor método de extração por solventes para conseguir o máximo de compostos fenólicos.
- Formular e elaborar nanopartículas dos compostos fenólicos dos resíduos da vinificação.
- Avaliar as nanopartículas quanto a suas propriedades físicas e químicas
- Avaliar a atividade antioxidante “*in-vitro*” e digestão gastro-intestinal simulada na boca-estômago-intestino, presentes nas nanopartículas.
- Avaliar o efeito das nanopartículas sobre o estresse oxidativo e longevidade “*in-vivo*” em *Caenorhabditis elegans*.

CAPÍTULO II

RESVISÃO DA LITERATURA

2.1 UVA

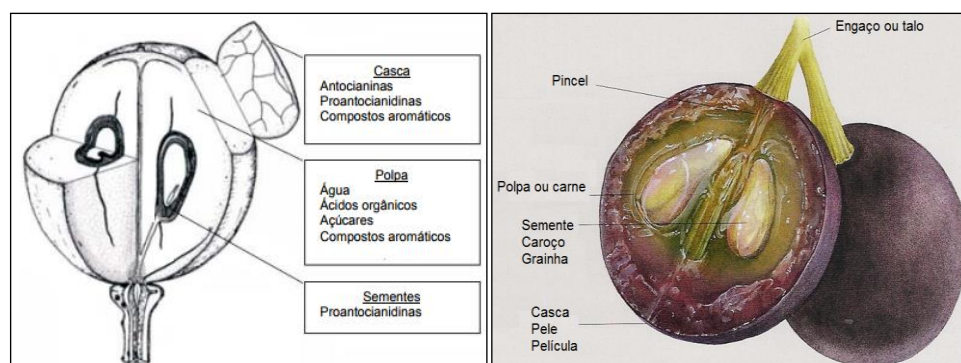
A uva é uma das frutas muito consumida desde a época antes de cristo até a atualidade em todo o mundo, existem variedades com diferentes características físicas e químicas. Apresentam antioxidantes que atuam como redutores de oxigênio singlete, importante para a inibição as reações de oxidação lipídica e quelação de metais. Além disso, apresentam propriedades antialergênicas, antiarteriogênicas, anti-inflamatórias, antimicrobianas, antitrombóticas e efeitos cardioprotetores (ROESLER et al., 2007; AHMAD et al., 2013; HOGAM et al., 2010). Estudos recentes mostraram evidências que os fenólicos de cereais, frutas e vegetais contribuem de forma significativa na redução da incidência de doenças crônicas e degenerativas, razão pela qual justifica o crescente estudo na área nos últimos anos (ROESLER et al., 2007; SOUZA, 2013; RIBEIRO, 2011).

A uva está composta por açúcares, ácidos, pectinas, gomas, compostos aromáticos e fenólicos, sendo açúcares, ácidos, compostos fenólicos, vitaminas, minerais, promotores de crescimento da baga da uva, ocorrendo acumulação de açúcares, formação de taninos, diminuição de ácidos, resultando na formação de aromas. A composição química da uva é definida pelo estágio de maturação, potencial genético, clima e manejo, sendo que suas propriedades e a sua composição estão vinculadas as condições e fatores envolvidos durante o seu desenvolvimento (MOTA et al., 2009)

Os compostos fenólicos da uva estão localizados principalmente nas partes sólidas: pele, semente e tecido vascular. Na polpa, destaca-se a presença de ácidos fenólicos e seus derivados. Os flavonóis e antocianinas estão localizados nas células da pele da uva. Ao contrário dos flavonóis presentes em uvas brancas e tinta, as antocianinas são encontradas apenas na casca da uva vermelha, sendo responsável pela cor vermelha característica desses vinhos. O flavan-3-oles está localizado nas sementes das uvas. O grupo de flavan-3-oles inclui monómeros e também oligómeros, pertencendo a este último as procianidinas presentes na semente. Nos vinhos brancos, os principais fenóis são os da polpa, enquanto nos vinhos tintos, a maceração alcoólica das peles e das sementes permite a liberação e solubilização no vinho. Os compostos fenólicos não coloridos mais abundantes na pele são flavan-3-ols em forma de monómeros, tais como catequina e epicatequina, bem como em oligómeros, formas poliméricas também chamadas proantocianidinas ou taninos condensados, estão presentes principalmente em sementes de uva. Estes compostos podem conter subunidades de ácido gálico, galato de epigallocatequina e epicatequina. As antocianinas são os principais pigmentos de uvas vermelhas localizadas na pele, aparecem durante o processo de amadurecimento,

sendo o principal responsável pela cor do vinho tinto. As principais antocianinas encontradas nas uvas derivam de cianidina, peonidina, delphinidina, petunidina e malvidina, e geralmente são produzidas como glicósidos e acilglicósidos; a malvidina-3-O-glucósido é o mais abundante. A baga de uva é formada em geral por 6 a 12% de casca, de 2 a 5% de semente e 85 a 92% de polpa. A polpa constitui a parte principal da uva e seus principais componentes são: 65 a 85% de água, 12 a 55% de açúcares redutores, 0,6 a 1,4% de ácidos orgânicos, 0,25 a 0,35% de substâncias minerais e 0,05 a 0,1% de compostos nitrogenados, além de conter vitaminas A, B1, B2, C e niacina, na Figura 1 se apresentam os componentes de uma baga de uva (XIA et al., 2010; ARVANITOYANNIS, 2006; XU et al., 2010).

Figura 1 - Componentes gerais de uma baga de uva



Fonte: Adaptado de Kennedy (2008)

Rizzon e Miele (2009) determinaram em mosto de uvas Merlot da serra gaúcha, no estado de Rio grande do Sul, valor de sólidos solúveis de 18,4 °Brix, acidez total de 104 meqL⁻¹ e pH de 3,21. Na Tabela 1 se apresenta a composição centesimal da uva patricia (*Vitis labrusca* L.) cultivada em Mato Grosso (AGUIL, 2005)

Tabela 1 - Composição centesimal da uva patricia (*Vitis labrusca* L.)

Componente	%
Umidade	82,4
Proteína	0,8
Extrato atéreo	0,25
Fibra bruta	0,1
Cinzas	0,5
Extrato não nitrogenado (ENN)	15,9

Fonte: Adaptado de Aguil (2005)

2.1.1 Cabernet Sauvignon

Considerada no mundo do vinho uma das mais nobres variedades de uva vermelha, o cultivo desta uva é bem particular, não permitindo excessos de calor ou seca (Figura 2a). É uma cultivar que apresenta cachos de comprimento e largura medianos, bagas esféricas pequenas e pretas, bem compactadas, sabor doce, agradável perfumado por um aroma característico. Ela oferece um mosto doce e agradável, de aroma que lembra a flor violeta, resultando após a vinificação, um vinho tinto escuro, encorpado, com um persistente odor agradável. O processo de envelhecimento é lento, portanto exigindo um longo tempo de guarda para adquirir toda sua qualidade. Quando jovem é o vinho mostra-se um pouco adstringente devido a o alto teor de taninos (FRAIGE, 2012)

2.1.2 Merlot

Segundo Rizzon e Miele, (2009), a uva Merlot é uma das responsáveis pelos vinhos Saint Èmilion da região de Bordeaux na França (Figura 2b). O mesmo autor ressalta que atualmente ela ocupa o segundo lugar na produção de vinhos finos no Brasil, cujo amadurecimento requer um tempo menor que guarda. Possui baixo teor de tanino, produzindo vinhos menos agressivos que os da Cabernet, razoavelmente encorpados, pouco ácidos e de cor intensa e paladar e olfato agradáveis, é utilizada para atenuar produtos mais fortes.

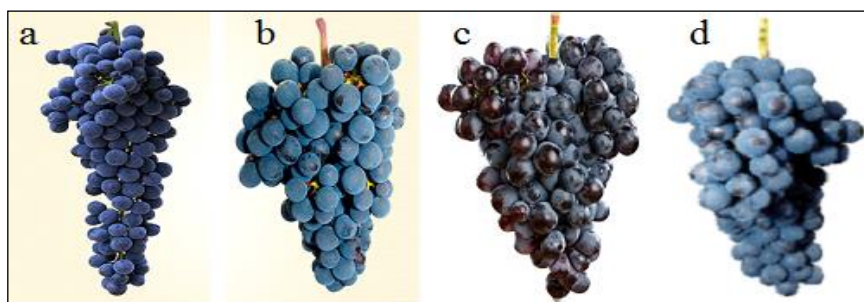
2.1.3 Pinot Noir

Pinot é considerada uma uva de difícil trato, dada a dificuldade de se obter consistência em termos de qualidade (Figura 2c). De acordo com os especialistas, a dificuldade se dá em função da instabilidade genética da uva Pinot Noir, sendo que as plantas de uma mesma família podem apresentar uvas completamente distintas em tamanho, formato e até sabor. Para se ter uma idéia de sua complexidade, a uva Cabernet Sauvignon é ilustrada pelas 12 variações genéticas, enquanto este número pode chegar a 1000 variações para uva Pinot Noir. Além disso, maior propensão a mofo, fungos e outras doenças denota a delicadeza envolvida no cultivo desta uva. Um vinho Pinot Noir varia de acordo com sua maturidade. Enquanto um exemplar jovem apresenta características de fruta simples tais como cereja, ameixa e morango, quando mais envelhecido apresenta sabores complexos de acordo com sua idade, revelando notas de chocolate, terroso, trufas e leve defumação (FRAIGE, 2012).

2.1.4 Shiraz

Originalmente proveniente do Cáucaso e conhecida na antiga Pérsia, é talvez a uma vinífera mais antiga do mundo (Figura 2d). Trazida para ocidente criou raízes na França, e hoje é a uva nacional de Austrália. Produz boms vinhos varietais, que muitas vezes possuem excesso de acidez e presença de taninos (FRAIGE, 2012).

Figura 2 - Cachos das uvas Cabernet sauvignon (a), Merlot (b), Pinot Noir (c) e Shiraz (d)



Fonte: Adaptado de Mello e Da silva (2015)

2.2 PRODUÇÃO DE VINHO NO MUNDO E NO BRASIL

Os cultivos de uva são atividades agro-econômicas difundidas no mundo com mais de 60 milhões de toneladas produzidas a nível mundial por ano, e o vinho, produto da fermentação de suco de uva, é uma das bebidas alcoólicas mais conhecidas e distribuídas em todo o mundo, com 271 milhões de hectolitros produzidos (MhL) em 2014 de acordo com o último boletim emitido pela Organização Internacional do Vinho (NARDOIA, 2015).

Existem três espécies principais de uvas distribuídas no mundo, uvas europeias (*Vitis vinifera*), uvas norte-americanas (*Vitis labrusca* e *Vitis rotundifolia*) e híbridos franceses (EN-QIN et al., 2010). A UE (União Europeia) é o maior produtor de vinho do mundo, dos 22,6 milhões de toneladas de uvas produzidas na UE em 2014, o 93% destinava-se à produção de vinho. Itália, Espanha e França foram os principais produtores de uvas de vinho da UE. A produção mundial de vinhos atingiu 271 MhL em 2014, incluindo os seguintes cinco produtores mundiais de vinho: França (46,2 MhL), Itália (44,4 MhL), Espanha (37 MhL), EUA (22,5 MhL) e, finalmente, Argentina (14,9 MhL) (Tabela 2).

No Brasil, as variedades de *Vitis labrusca* representam mais de 80% das uvas processadas, as uvas tintas mais cultivadas são *Bordô*, *Concord* e *Isabel*, que representam cerca de 50% da produção nacional de uvas. O cultivar *Bordô* (*Vitis labrusca*) tem-se

destacado por sua fácil adaptação as condições climáticas brasileiras e por apresentar excelente fertilidade e apreciável tolerância à doenças fúngicas, é sendo utilizada basicamente para a produção de vinhos e sucos (NIXDORF; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, 2010; PANCERI et al., 2013). A viticultura brasileira apresenta grande diversidade, devido a isso ocupando uma área de aproximadamente 82.500 hectares, com uma produção anual entre 1.300 a 1.400 mil toneladas, sendo que, em 2011, teve um aumento de 10% em relação ao ano anterior. Em 2010, foram processadas 526.800 mil toneladas, que passaram para 709.600 toneladas em 2011, diferença que refletiu no aumento em mais de 62.000.000 L de vinho de uvas comuns. Além disso, em 2011 foram comercializados em torno de 75.800.000 L de suco de uva. No ano de 2012, a produção de uvas destinadas ao processamento (vinho, sucos e derivados) foi de 830,92 milhões de quilos, o que representa aproximadamente 57% da produção nacional. O restante da uva (43%) foi destinado ao consumo *in natura* (MELO et al., 2011).

Tabela 2 - Produção de vinho em milhões de hectolitros (MhL).

Países	2010	2011	2012	2013	2014	Classificação-2014
França	44,381	50,757	41,584	42,004	46,151	1
Itália	48,525	42,772	45,616	52,429	44,424	2
Espanha	35,353	33,397	31,123	45,650	37,000	3
Estados Unidos	20,890	19,140	21,740	23,500	22,500	4
Argentina	16,250	16,250	15,473	11,780	14,984	5
Austrália	11,420	11,180	12,260	12,310	15,560	6
China	13,000	13,200	13,810	11,780	11,178	7
África do sul	9,327	9,725	10,568	10,980	11,420	8
Chile	8,844	10,646	12,554	12,845	10,028	9
Alemanha	6,906	9,132	9,012	8,409	9,725	10
Portugal	7,148	5,622	6,327	8,409	5,886	11
Roménia	3,287	4,058	3,311	6,238	4,083	12
Nova Zelândia	1,900	2,350	1,940	5,113	3,200	13
Grécia	2,950	2,750	3,115	2,480	2,900	14
Brasil	2,459	3,460	2,967	2,710	2,810	15

Fonte: Adaptada de Nordoia (2015)

2.3 RESÍDUOS DA INDÚSTRIA VINÍCOLA

Os tipos de resíduos estão relacionados aos procedimentos da vinificação e a maior percentagem de resíduos é representada por: resíduos orgânicos (contendo resíduos da imprensa/bagaço, polpa de uva, sementes, casca, hastes e folhas). Os principais resíduos da vinificação são formados pela pele, polpa e sementes de uva, que são obtidas após pressionar o mosto, e as hastes e folhas, que são previamente separadas das uvas em uma fase de desarme. O terceiro grupo de resíduos de vinho é formado pela fermentação, um precipitado que aparece no vinho formado pelas leveduras, que são depositadas no final do processo de fermentação, e outros compostos insolúveis em álcool (água residual, emissão de gases CO₂, compostos orgânicos voláteis, etc.) e resíduos inorgânicos (OLIVEIRA et al., 2013).

2.3.1 Bagaço de Uva

O bagaço de uva é um dos principais subprodutos da produção de vinho (Figura 3) e é obtido após o processamento da uva em suco ou vinho por meio da separação do produto líquido dos resíduos sólidos. Cerca de 20% do peso total das uvas utilizadas para o vinho é constituído por bagaço de uva. Por cada 100 kg de uva há 70 a 80 kg de casca de uva, 15 a 25 kg de sementes e 2 a 3 kg de hastes. A porcentagem de umidade varia de 50% a 72%, dependendo da variedade de uva considerada e do estado de amadurecimento. Os resíduos insolúveis da uva possuem um teor de lignina variando de 16,8% a 24,2% e um teor de proteína inferior a 4%. Em relação às proteínas, o ácido glutâmico é o aminoácido principal, juntamente com aminoácidos limitantes lisina, triptofano e sulfurados. A glicose é o principal açúcar solúvel em bagaço de uva que varia de acordo com o grau de extração de vinificação (LLOBERA; CAÑELLAS, 2007; MONRAND et al., 2010; MAIER et al., 2009; ROCKENBACH et al., 2011a). Alguns estudos apontaram que a pectina e o tanino podem ser considerados como parte da fibra dietética, na qual a pectina ramificada representa um terço de carboidratos (ácido urônico como ramnosa, arabinose e galactose) em fração de fibra solúvel, enquanto que o tanino condensado está relacionado à proteína em fração de fibra insolúvel pela capacidade de ligação às proteínas. Em geral, as substâncias pépticas são o principal constituinte do tipo polímero das paredes celulares presentes nos pomares de uva, variando de 37% a 54% dos polissacarídeos da parede celular. A celulose é o segundo tipo de polissacarídeos de parede celular em abundância em pomares de uva, variando de 27% a 37% (GONZÁLEZ-CENTENO et al., 2010; LLOBERA; CAÑELLAS, 2007)

Figura 3 - Resíduos da indústria vinícola

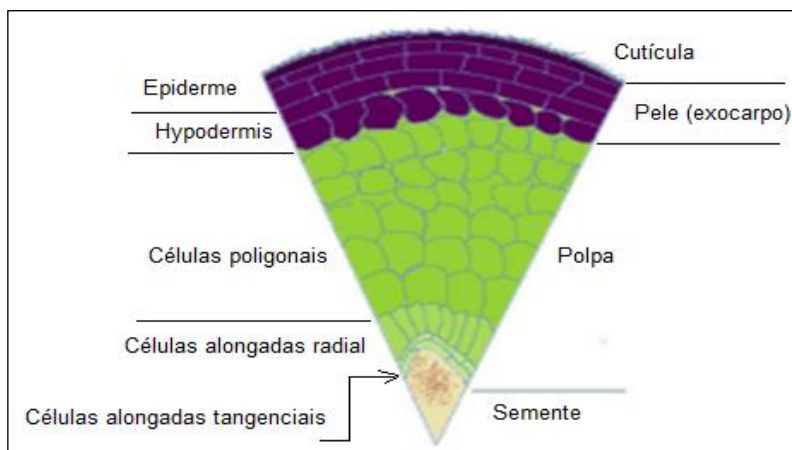


Fonte: Adaptado de Mello e Da Silva (2015)

2.3.2 Casca de uva

As cascas de uva representam cerca de 5-10% do peso seco total da uva e atuam como uma barreira hidrofóbica para proteger as uvas das lesões físicas e climáticas, desidratação, infecção por fungos e lesões climáticas e luz UV (Figura 4).

Figura 4 - Morfologia da uva



Fonte: Adaptada por Nordoia (2015).

Os tecidos da casca são caracterizados pela presença de capas (epidermis, cutícula, casca, pulpa e semente), o ácido graxo hidroxilado que compõe a camada mais externa, a cutícula e por proantocianidinas insolúveis (15%); representam 50% do peso seco com predominância de celulose, pectinas, hemiceluloses, xiloglucanos, arabinosilanos e mananos, seguidas de açúcares (principalmente glicose e frutose, total de 14%) e cinza (7,8%). Não foi detectada lignina em peles de uva. A cinza em peles é caracterizada como

potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), sódio (Na), ferro (Fe), manganês (Mn), cobre (Cu) e zinco (Zn). A camada interna, a hipoderme, que é a camada mais próxima da polpa, e que é composta de várias camadas celulares contém a maioria dos fenólicos na pele da uva (PINELO; ARNOUS; MEYER, 2006; MENDES et al., 2013).

2.3.3. Sementes de uva

A proporção relativa de sementes varia de 38% a 52% do material seco e representa aproximadamente 17% do peso do bagaço de uva fresco (Figura 5).

Figura 5 - Sementes da indústria vinícola



Fonte: Adaptado de Mello e Da Silva (2015)

A composição de sementes de uva (w/w) indica o conteúdo de até 40% de fibra, 16% de óleo essencial, 11% de proteína, 7% de compostos fenólicos complexos, como taninos e outras substâncias como açúcares e minerais. O fósforo (P) é o principal mineral nas sementes. As sementes de uva têm abundante gordura, principalmente ácido linoleico, seguido de ácidos oleico, palmítico, esteárico e mirístico. Na Tabela 3 se apresenta a composição mais completa (GHAFOOR et al., 2009; FERNANDES et al., 2013; TOSCANO et al., 2013; CAMPOS et al., 2008).

Tabela 3 - Composição parcial do resíduo, semente e casca de uva (base seca).

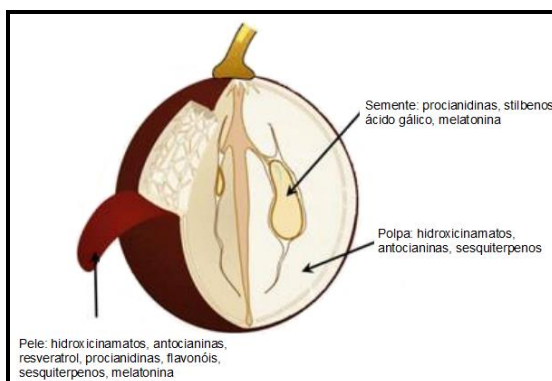
Componentes (%)	Resíduo de uva	Semente	Casca
Umidade	10-7	9-7	19-7
Proteína	11,2-13,8	9,3-14,6	11,0-13,8
Óleos	5,6-11,7	9,5-11,1	3,2-6,3
Cinzas	2,4-5,8	2,9	6,2-7,5
Fibra	32,5-56,3	41,4	30,6

Fonte: Dados relatados por Brenes et al. (2016).

2.3.4 Compostos fenólicos dos resíduos da vinificação

As pesquisas publicadas mostram que os resíduos da vinificação são fontes abundantes de compostos fenólicos, com elevada atividade antioxidante. Estes compostos são divididos em dois grupos: os não flavonóides (ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos, e estilbenos) e os flavonóides (antocianinas, compostos flavan-3-ols e flavonóis). Na uva, os compostos fenólicos estão presentes principalmente nas cascas e sementes, menores quantidades na polpa. Os flavonóis são compostos abundantes nas cascas, enquanto as sementes são ricas em flavan-3-ols (MONTEALEGRE et al., 2006). A distribuição média de compostos polifenólicos em bagas de uva é de cerca de 1% na polpa, 5% na pele e aproximadamente 62% nas sementes (Figura 6). O conteúdo de composição de polifenóis varia dependendo das variedades de uvas e é influenciada pela localização crescente, maturidade e tempo de fermentação. Principalmente, eles são armazenados nas vacuolas celulares da uva e podem ser facilmente liberados por esmagamento. O ácido gálico é descrito como o derivado de ácido hidroxibenzóico mais abundante em hastes de uva, cascas e sementes, seguido de ácido siringíco em hastes de uva e ácido protocatequico em sementes e peles de uva. O ácido galico é especialmente relevante devido ao seu papel como precursor de taninos hidrolisáveis. O ácido protocatequico é o ácido hidroxibenzóico mais abundante em sementes de uva e resíduos de variedades vermelhas, com maior concentração do que os outros derivados de ácido hidroxibenzóico (SHI et al., 2003; MONTEALEGRE et al., 2006; GUENDEZ et al., 2005; MAKRIS et al., 2007; ANASTASIADI et al., 2012; APOSTOLOU et al., 2013).

Figura 6 - Polifenóis em bagas de uva



Fonte: Adaptado de Nardoia (2015).

2.3.5 Resveratrol da uva

O resveratrol é uma fitoalexina produzido por diversas plantas como Kojo-kon (*Polygonum cuspidatum*), Kashuwu (*Polygonum multiflorum*), eucalipto amendoim, amora e também está presente em uvas (*Vitis vinifera* e *Vitis labrusca*). Na uva esta fitoalexina é sintetizada especialmente nas células da pele e semente, como resposta ao stress causado por ataque fúngico, dano mecânico ou por irradiação de luz ultravioleta e particularmente as infecções microbiológicas. O conteúdo do resveratrol depende da variedade da uva e demonstrou-se que nas uvas vermelhas é muito maior que as uvas brancas. O resveratrol é sintetizado naturalmente na planta sob duas formas isômeras: *trans*-resveratrol (*trans*-3,5,4'-trihidroxiestilbeno) e *cis*-resveratrol (*cis*-3,5,4'-trihidroxiestilbeno), (Figura 7). O isômero *trans*-resveratrol é convertido para *cis*-resveratrol em presença da luz visível, pois esta forma é mais estável. A forma de *trans*-resveratrol nos vinhos tintos está entre 0,03 e 7 mg/L. Suas propriedades terapêuticas são totalmente demonstradas, onde o consumo de resveratrol está relacionado a uma diminuição das doenças cardiovasculares (SAUTTER et al., 2005)

Figura 7 – Isômeros do resveratrol, (A) *trans*-resveratrol (B) *cis*-resveratrol



Fonte: Adaptado de Sautter et al. (2005)

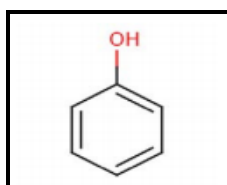
2.3.6 Atividade antioxidante dos compostos fenólicos

Podemos dividir os antioxidantes em duas classes: Na primeira com atividade enzimática, capazes de bloquear a iniciação da oxidação, eles removem as espécies reativas ao oxigênio entre elas superóxidos dismutase, a catalase e a glutathione peroxidase. Na segunda classe sem atividade enzimática, são moléculas que interagem com as espécies radicais e são consumidas durante a reação. Aqui se incluem os cofatores de enzimas antioxidantes (Selênio, Coenzima Q18), inibidores de enzimas oxidativas, quelantes de metais (EDTA) e os sequestradores de radicais livres (vitamina C e E). Os polifenóis são sequestradores de radicais livres, capazes de captar radicais alcóxila (RO*), alquilperóxila (ROO*), superóxido

(O₂*), radical hidroxila (HO*), óxido nítrico (NO*), além do oxidante peroxinitrito (ONOO/ONOOH) (BEHLING et al., 2004).

O termo "fenóis" compreende cerca de 8000 compostos que estão presentes na natureza, todos possuem uma estrutura comum, que é um anel de fenol (Figura 8), isto é, um anel aromático que contém pelo menos um substituinte hidroxilo. Os flavonóides são polifenóis com pelo menos 2 subunidades fenólicas e os compostos que possuem 3 ou mais subunidades fenólicas são chamados taninos (ROBBINS, 2003)

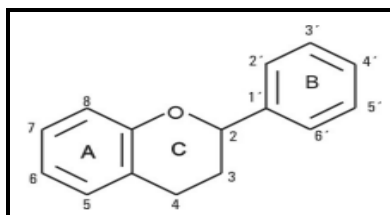
Figura 8 - Estrutura de um fenol



Fonte: Adaptado de Robbins (2003)

Os flavonóides são derivados fenólicos sintetizados pelas plantas, compreendem cerca de 4000 compostos identificados, são derivados hidroxilados, metoxilados e glicosilados de dois fenil benzo e pirano, que consiste em dois anéis de benzeno combinados através do oxigênio contido no anel de pirano (Figura 9). A capacidade antioxidante dos polifenóis é influenciada pelo número e posição dos grupos OH, assim como pelas posições de glicosilação. A propriedade antioxidante é direcionada sobre o radical hidroxil (*OH) e o anion superóxido (*O₂), que são espécies altamente reativas envolvidas na iniciação da peroxidação lipídica. Além destes efeitos importantes, os flavonóides têm propriedades estabilizadoras de membrana, podendo afetar alguns processos do metabolismo intermediário (GARRIDO; BORGES, 2013; ALASALVAR et al., 2001; CHAN et al., 2011; ISMAIL et al., 2010).

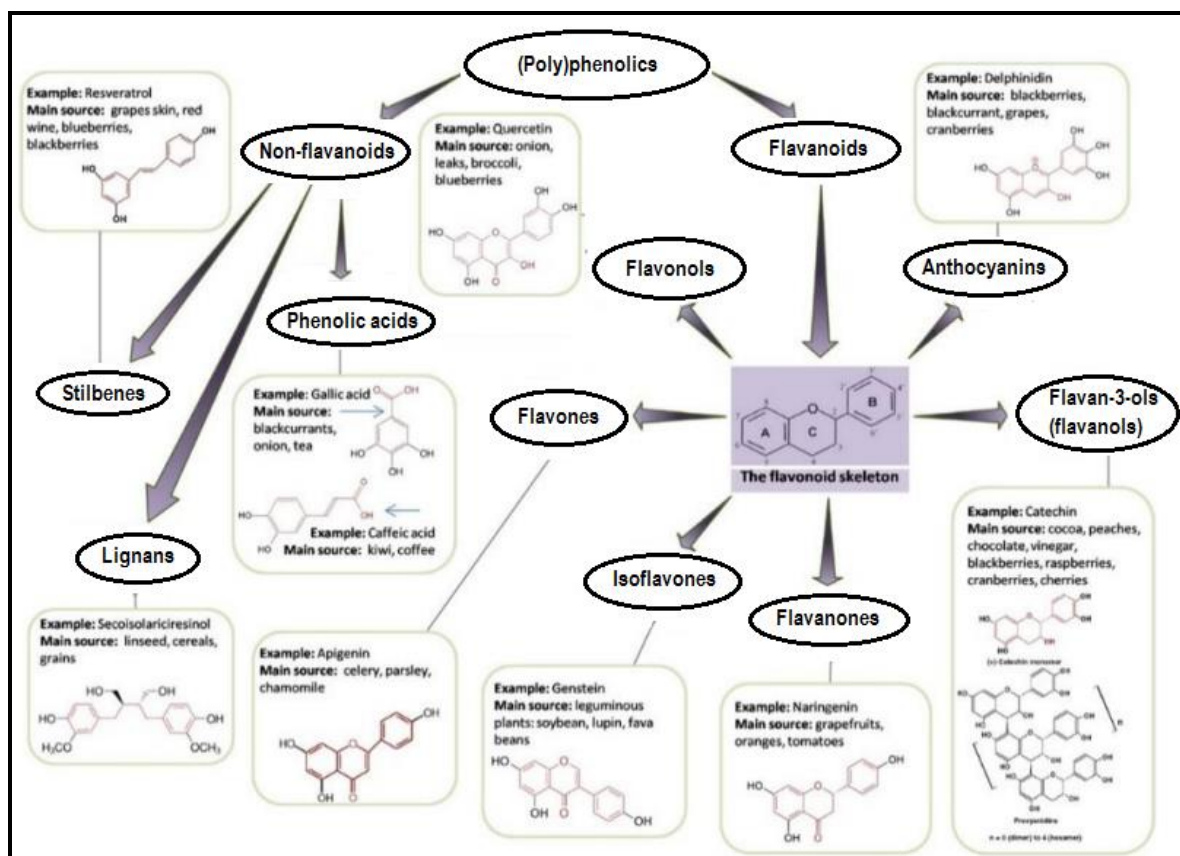
Figura 9 - Estrutura básica dos flavonóides



Fonte: Adaptado de Garrido e Borges (2013)

Os compostos fenólicos pertencem a uma classe que inclui uma diversidade de estruturas, simples e complexas, as quais possuem pelo menos um anel aromático no qual ao menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila, sendo assim o composto mais simples é o fenol. Eles podem ser classificados em dois grupos como se apresentam na Figura 10, os não-flavonóides e flavonóides. Na uva, os não flavonóides são principalmente ácidos fenólicos, os quais são geralmente divididos em dois grupos principais: os ácidos benzóicos, contendo sete átomos de carbono e os ácidos cinâmicos, compreendendo nove átomos de carbono (GARRIDO; BORGES, 2013; SILVA et al., 2010).

Figura 10 - Classificação de polifenóis



Fonte: Adaptado de Crozier, Jaganath e Clifford (2009)

2.3.7 Trabalhos sobre a atividade antioxidante em resíduos da vinificação

Jara-Palacios et al. (2014) estudaram os resíduos da vinificação conformada por cascas de uvas brancas da Espanha e determinaram sua atividade antioxidante pelo método de ABTS um valor entre 225-594,2 $\mu\text{mol TEAC/g}$.

Cataneo et al. (2008) estudaram os resíduos da uva bordô Couderc (*Vitis vinifera*), avaliaram sua atividade antioxidante pelo método de ABTS e determinaram um valor entre 42,69 a 98,92 $\mu\text{mol TEAC/g}$ e pelo método de DPPH um valor de 220,44 $\mu\text{mol Trolox/g}$

Xu et al. (2010) determinaram em resíduos de uva da variedade Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera*) uma atividade antioxidante por DPPH entre 324,62 e 152,56 $\mu\text{mol de trolox/g}$, respectivamente.

Rockenbach et al. (2011b) determinaram a atividade antioxidante pelo método DPPH em resíduos de uvas vermelhas da variedade Bordô e Isabel, de 361,12 e 188,02 $\mu\text{mol de trolox/g}$, respectivamente.

Burin et al. (2014) determinaram sobre os resíduos de uvas da variedade Bordô (uva vermelha) e Niágara (uva branca) de *Vitis labrusca*, uma atividade antioxidante por DPPH de 233,8 $\mu\text{mol de trolox/g}$ e 45,5 $\mu\text{mol de trolox/g}$, respectivamente.

2.4 METODOS DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

Existem muitos métodos de extração de compostos fenólicos (Tabela 4 e 5), geralmente são estudados a extração sólida-líquida mediante o uso de solventes e a finalidade destes métodos é determinar quimicamente a maior polaridade entre os metabolitos secundários e os solventes, apresentando uma solução aquosa com metabolitos de alta solubilidade. A maioria dos procedimentos para determinar polifenóis utiliza metanol aquoso ou acetona para extração. Marinova, Ribarova e Atanassova (2005) usaram 80% de solução aquosa metanol para extração em um banho ultra-sônico. Kennedy, Matthews e Waterhouse (2002) extraíram os fenólicos de cascas com acetona aquosa a 66% durante 24 h a 20 °C e evaporou o solvente após filtração do extrato. Montealegre et al. (2006) usaram metanol, água e ácido fórmico para extração de compostos fenólicos de peles liofilizadas e sementes.

Existem trabalhos que estudaram o metanol e a acetona (soluções aquosas a 80%, v/v com HCl a 0,1%) que foram testados na extração de fenólicos e os resultados obtidos foram comparados. A eficiência da extração foi verificada por re-extração do resíduo usando o mesmo procedimento. Foi notado que um passo de extração não foi suficiente para a remoção total da análise dos componentes das cascas, sementes e celulose. Segunda e terceira extrações dos resíduos foram realizadas, determinando a extração de compostos fenólicos no terceiro extrato. Portanto, os dois primeiros extratos foram combinados e depois analisados. A

extração de fenólicos totais, flavonóides totais, antocianinas totais e catequinas totais obtidas com extração com metanol/água (80/20) e acetona/água (80/20).

Tabela 4 – Teor de fenólicos determinados em metanol e acetona (cascas e semente) (TP: fenóis totais, TF: flavonóides totais, TA: antocianinas totais, TC: catequinas totais)

Uvas Vranec	Extratos-metanol (mg/g)	Extratos-acetona (mg/g)	Diferença, %
Cascas/TP	48,1 ± 1,13	48,4 ± 1,13	0,62
Cascas/TF	6,90 ± 0,42	7,01 ± 0,29	1,59
Cascas/TA	11,5 ± 0,68	11,9 ± 0,65	3,48
Cascas/TC	2,24 ± 0,18	2,71 ± 0,28	20,98
Sementes/TP	162 ± 5,65	166 ± 5,66	2,47
Sementes/TF	15,3 ± 0,75	18,9 ± 0,60	23,53
Sementes/TC	24,6 ± 1,15	25,3 ± 1,69	2,85

Fonte: Adaptado por Ivanova, Stefova e Chinnici (2010)

Tabela 5 – Extratos e compostos fenólicos produzidos por cultura de tecidos vegetais

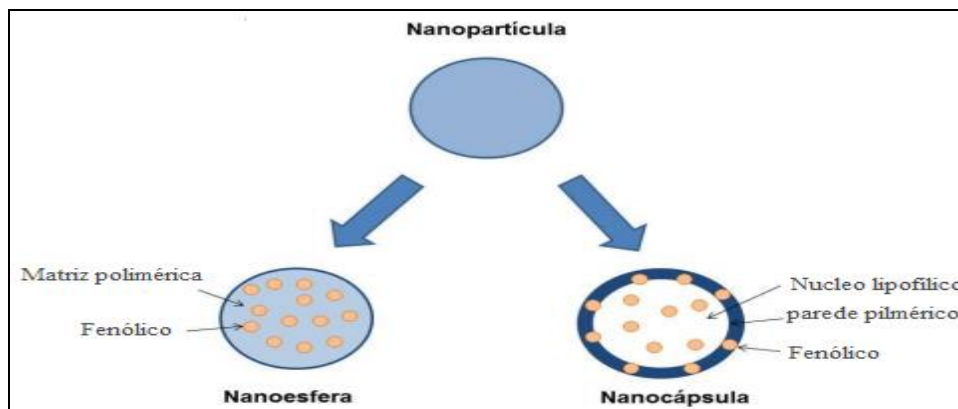
Extrato bioativo	Origem	Solvente de extração	Referência
Ácidos fenólicos	<i>Eryngium planum</i> L. (raízes e rebentos)	Água:Metanol (50:50, v/v)	Thiem et al., 2013
	<i>Schisandra chinensis</i> (Turcz.) Baill. (calli)	Metanol	Szopa e Ekiert 2012
	<i>Theobroma cacao</i> L. (antras)	Água:Metanol (20:80, v/v)	Alemanno et al. 2003
Compostos fenólicos	<i>Aloe arborescens</i> Mill rebentos	Água: Metanol (50:50, v/v)	Amoo et al., 2012
	<i>Aronia melanocarpa</i> (Michx.)	Metanol	Szopa e Ekiert, 2014
	<i>Cichorium pumilum</i> Jacq. (calli)	Água:Metanol (5:95, v/v)	Khateeb et al. 2012
	<i>Clitorea ternatea</i> L.(rebentos)	Etanol	Madhu 2013
	<i>Daucus carota</i> L. (raízes transgênicas)	Água:Metanol (50:50, v/v)	Sircar et al., 2007
	<i>Rehmannia glutinosa</i> Libosch (folhas e raízes)	Metanol	Piątczak et al., 2014
	<i>Salvia miltiorrhiza</i> Bunge (raízes transgênicas)	Água:Etanol (5:95, v/v)	Zhao et al., 2011
	<i>Salvia officinalis</i> L. (calli e células)	Acetona	Santos-Gomes et al. 2003
	<i>Vaccinium angustifolium</i> Ait. (folhas)	Água:Acetona:Ácido fórmico (20:80:0.1 v/v/%)	Goyali et al., 2014

Fonte: Adaptado por Dias (2016)

2.5 NANOENCAPSULAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

A nanoencapsulação é uma técnica que consiste no aprisionamento de um agente ativo (partículas sólidas, gotas de líquidos ou compostos gasosos) em um invólucro protetor (filmes finos ou coberturas poliméricas), para ser liberado em um determinado momento programado. O material a ser encapsulado é designado por núcleo, material ativo ou fase interna, enquanto o material que forma o revestimento é chamado de material de parede, carreador, membrana ou casca. O núcleo pode ser composto por um ou mais ingredientes e o material de parede pode ser formada por uma ou duas camadas (GHARSALLAOUI et al., 2007). A encapsulação pode ser classificada como nanocápsulas ou nanoesferas (Figura 11).

Figura 11 - Representação esquemática das nanopartículas



Fonte: Adaptado de Venturini, et al., 2011).

As nanocápsulas contêm um núcleo que está envolvido por um filme polimérico formando um sistema do tipo reservatório, e são tipicamente produzidas por coacervação complexa, secagem em leito fluidizado, co-extrusão e inclusão molecular. Já as nanoesferas, produzidas principalmente por *spray drying*, constituem um sistema matricial, no qual o polímero forma uma rede tridimensional onde o material a ser encapsulado pode estar adsorvido, incorporado ou ligado covalentemente à matriz polimérica, formando sistemas de dissolução, dispersão ou sistemas porosos (JAFARI et al., 2008).

Na indústria de alimentos e farmacêutica, a encapsulação é utilizada com o objetivo de revestir um ingrediente ou aditivos por um agente encapsulante de natureza comestível, modificando e melhorando a aparência e as propriedades de algumas substâncias, aumentar a vida de prateleira, proteger contra a luz, umidade e calor (AZEREDO, 2005; KUANG; OLIVEIRA; CREAN, 2010; AUGUSTIN; HEMAR, 2009; SANTOS et al., 2003).

O tamanho da nanopartícula pode fazer com que ela interaja e tenha uma captação maior com tecidos biológicos, além disso, devido à sua enorme reatividade química relacionada com a grande área superficial que apresentam em relação ao seu tamanho reduzido, as nanopartículas podem gerar respostas biológicas adversas (FARIA, 2010; ARORA; RAJWADE; PAKNIKAR, 2012).

2.5.1 Métodos de encapsulamento

Diversos métodos (químicos, físicos, ou físico-químicos) podem ser utilizados na realização do processo de microencapsulação (Tabela 6). A diferença entre eles está no envolvimento ou aprisionamento do material a encapsular pelo agente encapsulante. Dessa forma, devem ser consideradas as propriedades físico-químicas do material a encapsular e do agente encapsulante, a aplicação e finalidade, o tamanho, textura e forma das microcápsulas, bem como o mecanismo de liberação do material a ser encapsulado (BANSODE et al., 2010).

Tabela 6 - Métodos utilizados na elaboração de micro e nanopartículas.

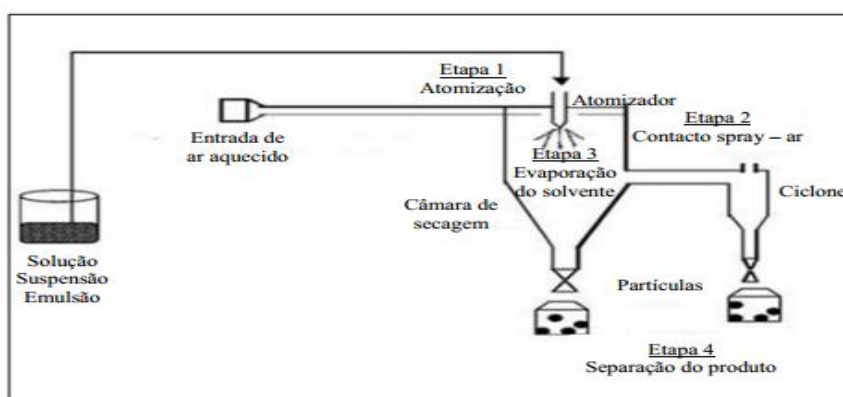
Metodo de micro-nanoencapsulação	Natureza do material do núcleo	Tamanho de partícula
Métodos físicos		
Extrusão estacionária	Líquido/sólido/gás	1000- 6000 μm
Extrusão centrífuga	Líquido/sólido/gás	125 – 3000 μm
<i>Spray drying</i>	Líquido/sólido	5 – 150 μm
<i>Spray chilling e spray cooling</i>	Líquido/sólido	20 – 200 μm
Leito fluidizado	Sólido	>100 μm
Co-cristalização	Sólido/líquido	---
Liofilização	Líquido	100-200 nm
Métodos químicos		
Polimerização interfacial	Líquido/sólido	1 – 500 μm
Inclusão molecular	Líquido	5 – 50 μm
Polimerização <i>in situ</i>	Líquido/sólido	1 – 500 μm
Métodos físicoquímicos		
Coacervação	Líquido/sólido	1 – 500 μm
Lipossomas	Líquido/sólido	100-120 nm
Lipoesferas	Líquido/sólido	0,02-10 μm
Evaporação do solvente	Líquido/sólido	1-5000 μm

Fonte: Adaptado de Desai e Parka (2005) e Madene et al. (2006)

2.5.1.1 Spray drying

O método de spray drying é um dos mais antigos métodos de encapsulação, tendo sido originalmente utilizado, na década de 30, para preparar os primeiros compostos contendo sabores encapsulados, usando como agente encapsulante a goma acácia. A substância a encapsular é homogeneamente dispersa ou dissolvida numa solução aquosa ou dispersão que contém o agente encapsulante, sendo o sistema atomizado numa corrente de ar quente. Posteriormente ocorre evaporação do solvente, obtendo-se a rápida solidificação de gotículas. Esta técnica baseia-se no bombeamento da solução até ao atomizador, onde é aspergida na forma de névoa de gotículas (spray), até a câmara de secagem. Neste compartimento ocorre a evaporação do solvente (secagem pelo ar quente) onde as gotas líquidas passam as partículas sólidas secas, que depois são recolhidas no ciclone ou em outro sistema de coleta de pó. A Figura 12 esquematiza as etapas envolvidas na técnica de microencapsulação por spray drying. As variáveis do processo são: as temperaturas do ar de entrada e de saída, o fluxo de ar ou do fluido de arrastre, a distribuição da temperatura e da umidade, o tempo de permanência e a geometria da câmara (WILSON; SHAH, 2007)

Figura 12 - Esquematização das etapas envolvidas no processo de encapsulação por spray drying



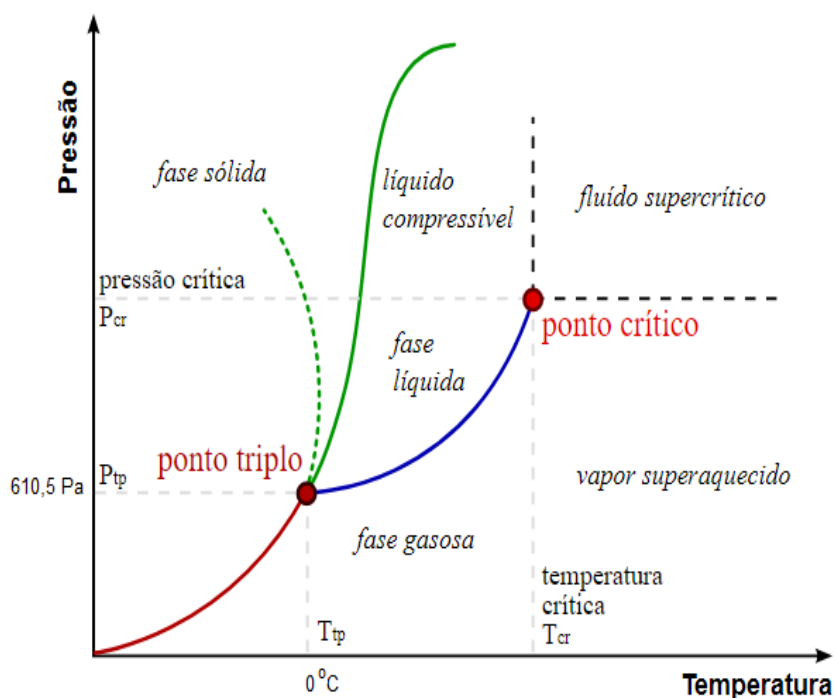
Fonte: Adaptado de Wilson e Shah (2007)

2.5.1.2 Liofilização

Consiste na secagem de um produto previamente congelado no qual a maior parte do solvente é removido por sublimação, sem a passagem pela fase líquida. Geralmente, este solvente é a água (POLAK; PIOTOMBO, 2011). Este processo envolve três etapas principais: congelamento, secagem primária e secagem secundária. Depois de congelada, a

água é removida do material por sublimação (secagem primária). Em seguida, a água que continua descongelada, remanescente da primeira etapa, é então removida por dessorção através da redução da pressão. Além de ser utilizada no processo de secagem, a liofilização pode ser empregada como método de encapsulação de um material ativo. A liofilização está baseada no ponto triplo da água, onde há a coexistência dos três estados físicos (sólidos, líquidos e gasoso) na temperatura de aproximadamente 0 °C e na pressão de 610 Pa. Assim, é possível a passarem direta do estado sólido para o gasoso, conhecida como sublimação, como é demonstrada na Figura 13 (MARTINS et al., 2011)

Figura 13 - Diagrama de fases da água



Fonte: Adaptado de Boo, Filho e Toledo (2004)

2.5.1.3 Emulsificação

As nanoemulsões, também referidas na literatura como miniemulsões, emulsões ultrafinas, microemulsões instáveis, submicroemulsões, são uma classe de emulsões que podem apresentar aparência translúcida quando o tamanho de glóbulo é inferior a 200 nm ou leitosa quando o tamanho está entre 200 - 1000 nm. As nanoemulsões são superiores às soluções micelares em termos de potencial de solubilização de substâncias, por isso, são usadas para aumentar a solubilização e a absorção de fármacos lipofílicos. As nanoemulsões possuem diversas vantagens em relação aos veículos tradicionais, como as relatadas a seguir:

São capazes de veicular fármacos lipofílicos em um sistema disperso aquoso e seu tamanho reduzido proporciona uma elevada superfície de contato com as membranas biológicas, favorecendo a absorção; Possuem maior área superficial e energia livre com relação às macroemulsões, características que conferem com um efetivo sistema de transporte. O diminuto tamanho dos glóbulos, associado ao movimento browniano característico, diminui a atuação da força da gravidade evitando processos de instabilidade como sedimentação e cremagem. Podem ser formulados em várias formas farmacêuticas, tais como espumas, cremes e sprays (FERNANDEZ et al., 2004; SHAH; BHALODIA; SHELAT, 2010).

2.5.2 Materiais de parede

A seleção do agente carreador depende das propriedades físico-químicas do material a ser seco, do processo utilizado para formar a partícula e das propriedades finais desejadas.

Tabela 7 - Principais agentes carreadores em alimentos

Classe	Agentes carreadores
Carboidratos	Amido, maltodextrinas, xarope de milho, dextrana, sacarose e ciclodextrina.
Celulose	Carboximetilcelulose, metil e etil celulose, acetil celulose e nitrocelulose.
Gomas	Goma arábica, agar, alginato de sódio e carragena.,
Lipídios	Cera, parafina, triestearina, ácido esteárico, mono e diglicerídeos, óleos e gorduras.
Proteínas	Glúten, caseína, gelatina, albumina, hemoglobina e peptídeos.

Fonte: Adaptado de Tonon (2009)

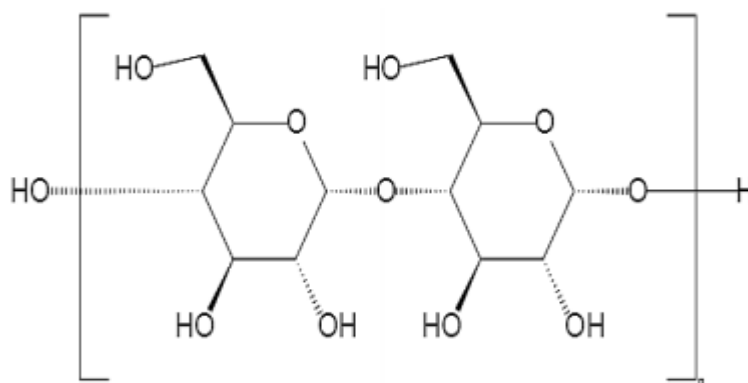
Um material de cobertura ideal deve ser insolúvel e não-reativo com o material de recheio, ser de fácil manipulação (apresentar uma baixa viscosidade a altas concentrações), ter habilidade para dispersar ou emulsificar o material ativo e estabilizar a emulsão produzida, lacrar e segurar o material ativo dentro da sua estrutura durante o processamento e estocagem. Além disso, deve liberar completamente o solvente ou outro material que será usado durante o processo de encapsulação, proporcionar a máxima proteção ao material ativo contra condições ambientes, ser solúvel em solventes aceitáveis na indústria de alimentos e apresentar boa disponibilidade no mercado e baixo custo (GHARSALLAOUI

et al., 2007; DESAI; PARK, 2005). Os principais agentes carreadores geralmente empregados na indústria de alimentos são apresentados na Tabela 7.

2.5.2.1 Maltodextrina

Maltodextrinas são carboidratos formados por hidrólise parcial, através da ação de ácidos ou enzimas e estão disponíveis em diferentes níveis de dextrose equivalente (DE), indicando o nível de hidrólise do polímero de amido (Figura 14) (GHARSALLAOUI et al., 2007). Na indústria de alimentos, as maltodextrinas são utilizadas para diversos fins, como agente espessante, substituto de gordura, formador de filmes, no controle do congelamento para prevenir cristalizações e como complemento nutricional (WANG; WANG, 2000). No processo de microencapsulação de ingredientes alimentícios, maltodextrinas têm sido extensivamente utilizadas por apresentarem habilidade na proteção dos materiais encapsulados contra oxidação, sendo este fato atribuído à sua capacidade de formar filme, às suas propriedades plásticas e ao seu poder redutor (ELNAGGAR et al., 2010). Outro fator importante está relacionado às suas propriedades físico-químicas e ao seu baixo custo de aquisição (KILMARTIN; REID; SAMSON, 2004).

Figura 14 – Estrutura química da maltodextrina.

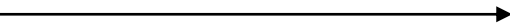


Fonte: Adaptado de Carareto et al. (2010).

As maltodextrinas apresentam uma ampla distribuição de massa molecular entre polissacarídeos e oligossacarídeos e estão disponíveis comercialmente, na forma de um pó branco ou de soluções concentradas. Ao contrário de amidos naturais, elas são solúveis em água fria. As maltodextrinas são geralmente descritas por seu valor de dextrose equivalente (DE), que é uma medida do inverso do número de unidades de α -D-glicose anidra, e está

ligada ao seu grau de polimerização (DP), de forma que $DE = 100/DP$. Assim, a especificidade das propriedades das maltodextrinas está ligada ao DE e ao DP, que mudam de acordo com o grau de hidrólise e o tratamento enzimático. São definidas como maltodextrinas os produtos com valores de DE menores que 20. Estes produtos são pouco higroscópicos, não apresentam doçura e são bastante usados para contribuir com o corpo de sistemas alimentícios. Já a hidrólise do amido a valores de DE entre 20 e 60 resulta em uma mistura de moléculas denominada “xarope de milho sólido”, que apresenta uma leve doçura e maior capacidade de absorver umidade. Variações nos valores de DE resultam em maltodextrinas com propriedades físico-químicas diferentes. Algumas destas características estão apresentadas na Tabela 8 (TONON, 2009).

Tabela 8 - Características dos amidos e seus hidrolisados, de acordo com sua DE

Propriedade	Dextrose equivalente (DE)						
	5	10	15	20	25	36	42
Escurecimento não enzimático							
Higroscopicidade							
Doçura							
Viscosidade							
Solubilidade							

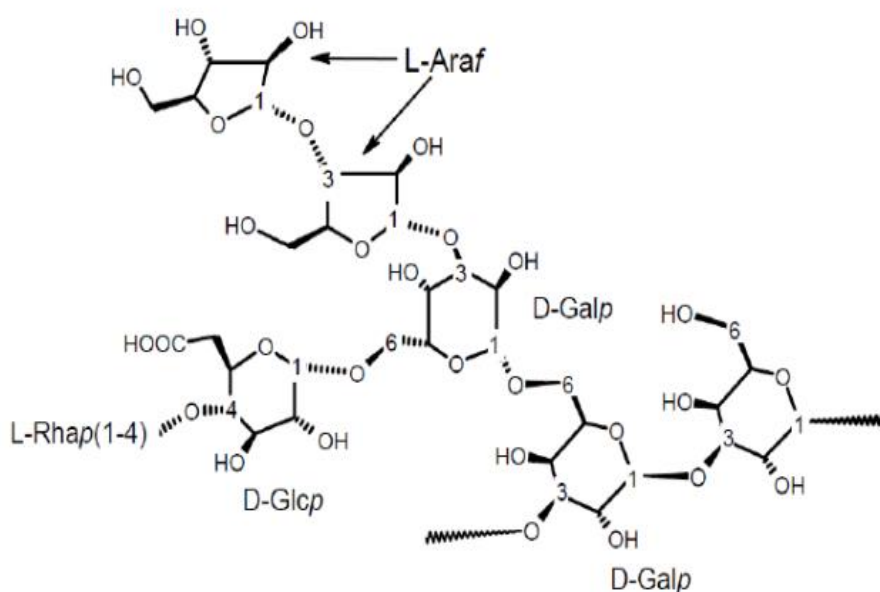
Fonte: Adaptado por Tonon (2009).

2.5.2.2 Goma arábica

A goma arábica é constituída principalmente por arabina, mistura complexa de sais de cálcio, magnésio e potássio do ácido arábico. Este ácido é um polissacarídeo que produz L-arabinose, D-galactose, ácido D-glucurônico e L-ramnose, após hidrólise. As unidades de D-galactopirranose em ligação 1,3 formam a cadeia estrutural da molécula, e algumas das unidades de D-galactopirranose contêm cadeias laterais na posição C-6, constituídas por duas unidades de D-galactopirranose em ligação 1,6 terminadas por uma unidade de ácido glucurônico em ligação 1,6 (Figura 15). A goma arábica contém 12% a 15% de água e composta de duas frações: a primeira composta de polissacarídeos, os quais apresentam pouco ou nenhum material nitrogenado (70% da composição da goma) e a segunda fração composta de moléculas de elevado peso molecular e proteínas integrantes da estrutura. A goma arábica dissolve prontamente em água, gerando soluções claras que variam

da coloração amarelo muito pálido para laranja dourado, e com um pH de aproximadamente 4,5. Uma característica funcional da goma arábica é sua habilidade de agir como um emulsificante para óleos essenciais e aromas. Os componentes de alta massa molecular ricos em proteínas são adsorvidos preferencialmente na superfície das gotas de óleos. As cadeias de polipeptídeos hidrofóbicos adsorvem e ancoram as moléculas na superfície, enquanto que os blocos de carboidrato inibem a floculação e coalescência por fenômeno de repulsão eletrostática e estérica (BUFFO; REINECCIUS; OEHLERT, 2001).

Figura 15 - Estrutura química da goma arábica



Fonte: Adaptado de Guilherme (2006)

2.6 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE MICRO E NANOPARTÍCULAS

A determinação das características físico-químicas de nanopartículas é de fundamental importância para conhecer a estabilidade e para o estabelecimento de parâmetros de fabricação que possam controlar a liberação dos encapsulados ou fármacos apartir dos mesmos. Porém, necessita-se da utilização de várias técnicas a fim de caracterizar estes sistemas, para a análise da morfologia das partículas, determinação da distribuição de tamanho, do potencial elétrico superficial (potencial zeta), calorimetria diferencial de varredura (DSC), determinação da concentração da nanocápsula quando associado às nanoestruturas e sua cinética de liberação.

2.6.1 Análise termogravimétrica

É uma técnica que se usa para avaliar a estabilidade térmica das micropartículas é a análise termogravimétrica. Baseia-se na medição da perda de massa contínua devido a temperatura, que aumenta de forma controlada. Esta perda de massa relaciona-se com a estrutura molecular, surgindo devido a evaporação da mistura residual, quando a temperatura é baixa, ou a deterioração do polímero, quando a temperatura é elevada. Desta forma, a perda de massa traduz-se numa alteração na composição que é característica de cada polímero (TAKAHASHI, 2009). Esta técnica mede a diferença de energia necessária à substância e de um material de referência, inerte de modo térmico, enquanto ambos são submetidos a uma variação controlada de temperatura. Essas variações são devidas a processos físicos e químicos como, fusão, decomposição ou transição de uma fase cristalina para outra. A calorimetria exploratória diferencial permite medidas da diferença de energia fornecida a uma substância e a um material de referência, em função da temperatura, enquanto a substância e o material de referência são submetidos a uma programação controlada de temperatura. Estas medidas fornecem dados qualitativos e quantitativos em relação a mudanças físicas e químicas que envolvem processos endotérmicos e exotérmicos ou mudanças de massa na capacidade calorífica. Podemos citar algumas informações sobre caracterização e medidas específicas como: transição vítrea, temperatura e tempo de cristalização, ponto de fusão, calor específico, oxidação, estabilidade térmica, cinética de reação, etc. De acordo com o método de medição utilizado, existem dois tipos de equipamentos de DSC:

- DSC-fluxo de calor
- DSC-compensação de potência

No primeiro tipo, a amostra e a referência são aquecidas por uma única fonte de calor e colocadas em cadinhos idênticos. O calor é transferido através do disco para a amostra e a referência e o fluxo de calor diferencial entre os dois cadinhos é controlado por termopares conectados abaixo dos cadinhos. Desta forma, a curva calorimétrica é apresentada na forma de diferença de temperatura entre a amostra e a referência em função do tempo ou da temperatura. Já no DSC de compensação de potência, a amostra e a referência são aquecidas e resfriadas individualmente. Garante-se uma diferença de temperatura entre a amostra e a referência, devido à absorção ou perda de calor; a potência nos aquecedores individuais é ajustada de forma que restaure o equilíbrio.

A curva resultante de uma análise de calorimetria exploratória diferencial permite calcular a variação de entalpia ocorrida em um processo pelo cálculo da área sob o

pico obtido. A direção do pico indica o tipo de processo observado. Em um aparelho de DSC com compensação de potência, o pico endotérmico é representado por uma variação de linha base para cima, enquanto que um pico exotérmico apresenta uma variação de linha base para baixo. Para sistema com fluxo de calor, ocorre o inverso. O maior número de aplicações da técnica de DSC está concentrado no estudo de compostos poliméricos para determinação do calor específico, de cristalização e de fusão, e das entalpias de fusão, cristalização e de reação (TAKAHASHI, 2009).

2.6.1.1 Temperatura de transição vítrea (T_g)

A temperatura de transição vítrea é considerada uma transição termodinâmica de 2ª ordem e está associada à fase amorfa do material. Sendo de 2ª ordem, afeta variáveis termodinâmicas secundárias como o coeficiente de expansão, índice de refração, calor específico, além de variáveis mecânicas, como módulo de elasticidade e capacidade de deformação plástica. Um polímero está no estado vítreo, quando se encontra abaixo da T_g , não havendo energia interna suficiente para permitir o deslocamento de uma cadeia com relação à outra, este se torna duro, rígido e quebradiço. A temperatura de transição vítrea (T_g) consiste no valor médio de uma faixa de temperaturas, passando de uma temperatura muito baixa para valores mais altos, permitindo que cadeias poliméricas da fase amorfa adquiram mobilidade (TAKAHASHI, 2009).

2.6.2 Análise morfológica das nanopartículas

Uma das formas para avaliar a morfologia das micro-nanopartículas é a microscopia eletrônica de varredura (MEV), esta técnica permite obter informação morfológica e informação de superfície. É possível visualizar detalhes, como a forma e características de superfície, de materiais heterogêneos numa escala micrométrica (μm) ou nanométrica (nm). A capacidade de obter imagens com grande precisão e tridimensionais torna as análises microscópicas de MEV (DIXIT et al., 2010).

2.6.2.1 Microscopia eletrônica de varredura - MEV

A microscopia eletrônica de varredura tem sido muito empregada para a caracterização de micro e nanoestruturas na forma de pós, o que facilita o estudo da

morfologia da superfície destas, além de auxiliar na avaliação de mudanças na forma das nanoestruturas depois de terem sofrido secagem (ABDELWAHED; DEGOBERT; FESSI, 2006). Nesta técnica, a amostra é depositada sobre uma fita de carbono dupla face e metalizada, ou seja, recoberta com uma fina camada de metal condutor. Em seguida, a amostra é submetida a um fluxo de elétrons sobre sua superfície que gera uma imagem da topografia da amostra. O princípio de funcionamento do MEV consiste na passagem de corrente elétrica por um filamento de tungstênio (eletrodo negativo) que promove uma elevação de temperatura ($\sim 2.500^{\circ}\text{C}$), gerando uma emissão térmica de elétrons mediante a aplicação de uma diferença de potencial que pode variar de 0,5 a 30 KV, o que permite a variação da aceleração dos elétrons. A parte positiva em relação ao filamento do microscópio (eletrodo positivo) atrai fortemente os elétrons gerados, resultando numa aceleração em direção ao eletrodo positivo. A correção do percurso dos feixes é realizada pelas lentes condensadoras que alinham os feixes em direção à abertura da objetiva. A objetiva ajusta o foco do feixe de elétrons antes deles atingirem a amostra incidindo sobre uma determinada área selecionada (SCHAFFAZICK et al., 2003).

2.6.3 Tamanho e distribuição de partículas

O tamanho médio das partículas e a distribuição do tamanho, medida pelo índice de polidispersão (IP) das nanodispersões são parâmetros muito importantes na área de nanotecnologia farmacêutica. O tamanho determina em muitos casos a distribuição das partículas *in vivo*. O tamanho das nanopartículas depende de vários fatores: método de preparação, natureza do material utilizado, peso molecular e concentração do polímero utilizado, características físico-químicas do encapsulado, concentração de tensioativos, proporção entre fase oleosa e aquosa, a viscosidade das fases utilizadas, a velocidade de agitação e também a velocidade de difusão da fase orgânica na aquosa em alguns métodos. Em relação à estabilidade, o tamanho das nanopartículas é importante, pois pode evidenciar a tendência destes sistemas à agregação ao longo do tempo. A espectroscopia de correlação de fótons (ECF) é considerada o método padrão para a determinação do diâmetro médio e da distribuição do tamanho (IP). Esta técnica baseia-se na análise do movimento das partículas na água que é inversamente proporcional ao seu tamanho, podendo ser detectado pela correlação do tempo das flutuações de intensidade da luz espalhada quando as nanopartículas são iluminadas por um feixe de laser. Estas flutuações na intensidade da luz espalhada são relacionadas à velocidade de difusão das partículas para dentro e para fora da região que está

sendo estudada, e os dados podem ser analisados para fornecer coeficientes de difusão das partículas que fazem o espalhamento. Assim, a partir dos coeficientes de difusão, os dados são processados para fornecer o tamanho da partícula considerada esférica (MOSQUEIRA et al., 2005; SCHAFFAZICK et al., 2003).

2.6.4 Potencial zeta

O potencial zeta pode ser definido como o potencial de superfície das partículas que pode ser influenciado por mudanças na interface com o meio externo, decorrente da dissociação de grupos funcionais presentes na superfície ou da adsorção de espécies iônicas do meio de dispersão. Geralmente o potencial zeta é calculado por medidas de mobilidade eletroforética que correspondem à velocidade das partículas em suspensão, quando submetidas a um campo elétrico. Quanto maior a carga superficial, maior será a velocidade com que as partículas deslocam em direção aos eletrodos de carga oposta, sendo esta velocidade medida através da técnica de espalhamento da luz. As partículas podem ter uma carga elétrica positiva ou negativa. Se ela for positiva, atrairá íons negativos (contra-íons) presentes na solução formando uma camada ou nuvem de elétrons ao seu redor. Se a partícula for negativa, atrairá íons positivos. A superfície que separa a camada de cargas da superfície da partícula da camada difusa em torno dela é chamada de plano de cisalhamento. O potencial eletrostático apresentado neste plano de cisalhamento é o potencial zeta. Os equipamentos medem o potencial zeta neste plano. Um valor em módulo de potencial zeta entre 30-60 mV é considerado como importante para a estabilidade de colóides uma vez que as forças repulsivas evitam agregações entre as partículas em dispersão. O potencial zeta pode ser afetado pelos componentes da formulação (SCHAFFAZICK et al., 2003).

2.7 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA DIGESTÃO GASTROINTESTINAL

2.7.1 Digestão gastrointestinal das nanopartículas

Quando se consome nanopartículas podem não ser totalmente absorvidos pelo organismo e têm uma resistência ao processo de digestão gastrointestinal, ser absorvidos e não serem biotransformados, pelas enzimas de biotransformação, em metabolitos sem actividade biológica. Assim, para além de efectuar o doseamento destes é importante determinar a proporção que é libertada da matriz da nanopartícula e que fica realmente

disponível para ser absorvida, ou seja, a sua bioacessibilidade e a proporção que é realmente absorvida, ou seja que passa através das membranas celulares, e que fica disponível para ser utilizada pelas células. Os compostos bioativos não absorvidos pelo organismo podem ainda exercer os seus efeitos benéficos ao longo do tubo digestivo, podendo, mesmo assim, contribuir para a promoção da saúde (HOLST; WILLIAMSON, 2008).

Após a absorção, as nanopartículas são transportadas a diversas partes do organismo, através de duas vias distintas. A água, ions e produtos hidrossolúveis (ex: glicose e aminoácidos) entram no sistema porta (sistema de veias portais que transporta o sangue dos intestinos, estômago, baço e pâncreas para o fígado) e são conduzidos para o fígado. Quanto aos ácidos graxos e glicerol entram nos capilares linfáticos, através dos quais são transportados até ao tecido adiposo e fígado. Muitos dos fitoquímicos ingeridos apresentam uma baixa biodisponibilidade, especialmente quando comparados com os macronutrientes, devido ao fato de serem reconhecidos pelo organismo como compostos xenobióticos (HOLST; WILLIAMSON, 2008).

A metabolização pela flora intestinal tem sido pouco estudada, mas pode ter um efeito preponderante nas actividades biológicas destes partículas, uma vez que as nanopartículas que não forem absorvidos no trato gastrointestinal podem ser metabolizados por estas bactérias, originando metabolitos passíveis de ser absorvido no epitélio do cólon e, desta forma, chegar à corrente sanguínea (WILLIAMSON; MANACH, 2005).

As nanopartículas dentro do trato gastrointestinal podem ser absorvidas por algumas áreas e migrar para a corrente sanguínea ou para outros órgãos, também interagir localmente com a camada mucosa, essa interação pode levar a problemas fisiológicos, metabólicos e imunológicos. A migração de certas nanopartículas através da barreira intestinal consiste em várias etapas: difusão na camada mucosa, contato com enterócitos ou células M (enterócitos especializados na absorção de antígenos luminal) e possível transporte celular. O caminho mais comum de nanopartículas através de células epiteliais parece ser endocitose (um processo no qual a célula engole grandes moléculas ou partículas), porém o tamanho das nanopartículas têm influência na absorção e onde as maiores absorções ocorre com pequeno tamanho de partículas de aproximadamente de 50 nm. A estabilidade das nanopartículas respeito a sua diluição e consequente liberação de iões depende do pH do fluido onde são imersos, da duração de sua permanência no fluido e de sua composição. O nível de pH depende das regiões gastrointestinais, isso poderia alterar a agregação ou aglomeração das nanopartículas e alterar a sua superfície química. O conhecimento sobre os

parâmetros de dissolução nos fluidos gastrointestinais pode ajudar o transporte de nanopartículas e sua subsequente concentração no sangue (PETERS et al. 2012)

Walczak et al. (2013) utilizou um modelo digestivo humano in vitro para demonstrar que após a digestão gástrica, o número de nanopartículas de 60 nm diminui porque são aglomeradas pela interação com íons Cl^- , porém, o número aumentou novamente quando estavam sob condições intestinais.

A mucosa intestinal é uma rede complexa de glicoproteínas, lipídios, células e macromoléculas séricas (anticorpos), é a primeira barreira que as nanopartículas atendem, a carga elétrica de superfície pode ser crucial para que seja atravessada. Uma rede neutra ou com uma carga elétrica de superfície positiva pode prevenir a mucoescendência, isso favorece a penetração, enquanto a passagem de compostos hidrofílicos (ou lipofílicos) negativamente carregados é impedida. Também foi demonstrado que pequenas nanopartículas penetram na camada mucosa mais fácil do que grandes nanopartículas. (CRATER; CARRIER, 2010).

2.8 *CAENORHABDITIS ELEGANS*

2.8.1 Características

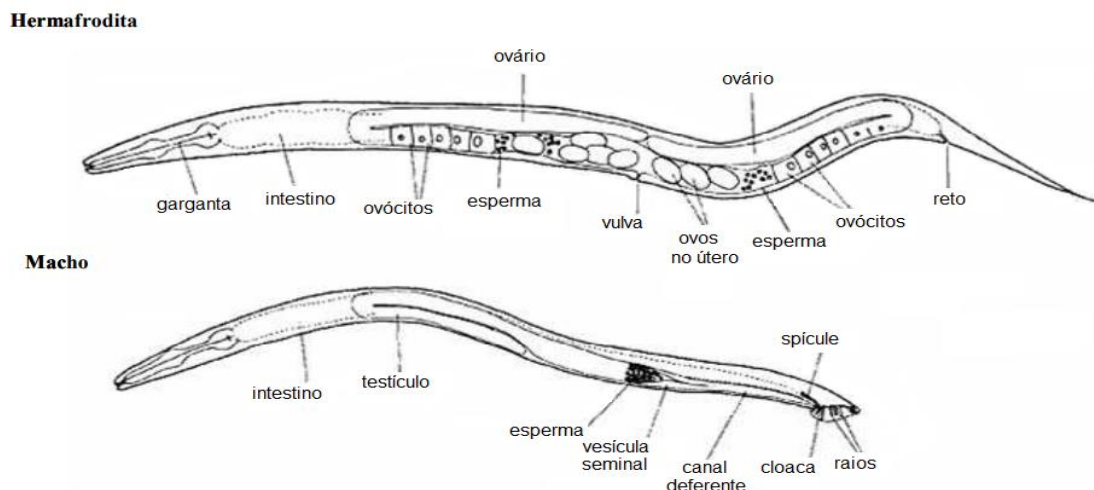
Caenorhabditis elegans é um nematóide redondo (Figura 16), não parasítico e de vida livre que normalmente vive no solo, em toda a faixa de temperatura das regiões do mundo, alimenta-se a partir de microorganismos como bactérias (*E. coli* e fungos). Requisitos para seu cultivo e reprodução precisa de um ambiente úmido, temperatura ambiental entre 10 °C e 25 °C, oxigênio atmosférico e bactérias como alimento. É hermafrodita, o que torna possível cultivá-lo no laboratório em grandes quantidades, tanto em meio líquido quanto em placas de petri, e se propagam rapidamente várias formas mutantes de uma maneira fácil e barata. Adultos eles são apenas cerca de 1 mm de comprimento e 70 μm de diâmetro e, portanto, eles só exigem um pequeno espaço para a manutenção. Seus movimentos são restritos a ondas sinusoidais macias, quase inteiramente em um plano simples dorsoventral. Não emitem odor intenso e sua aparência transparente é bastante atraente e facilita seu tratamento e observação. Um microscópio confocal é suficiente para o gerenciamento de rotina. Entretanto, o crescimento rápido e a capacidade de autofertilização requerem medidas especiais para estabilizar um cultivo sincronizado. O tamanho do genoma de *C. elegans* é de 97 milhões de pares de bases, cerca de 20 vezes maior que o de *E. coli* e cerca de 1/30 do

humano. Foi o primeiro organismo multicelular para o qual seu genoma foi completamente seqüenciado, em 1998 (SURCO, 2011).

2.8.2 Sexo

Existem duas formas sexuais, masculinas e hermafroditas, sendo esta ultima a predominante. Hermafroditas produzem esperma e ovos, e podem se reproduzir por autofertilização, sem acasalamento. O macho produz apenas esperma e para sua reprodução deve se acasalar com uma hermafrodita. Após do acasalamento, os espermatozóides masculinos competem com os espermatozóides do hermafrodita na fertilização dos ovos e a maior parte da progênie é o resultado da fertilização cruzada. Os ovos fertilizados são tomados e desenvolvidos internamente por várias horas, o período exato aumenta com a idade da hermafrodita. Uma hermafrodita simples produz aproximadamente uma progênie de 300 indivíduos hermafroditas por autofertilização, enquanto a fertilização cruzada pode produzir mais de 1000 vermes machos e hermafroditas em proporções iguais (GEMS; RIDDLE, 2000; SURCO, 2011).

Figura 16 - Larva de *C. elegans* adulto



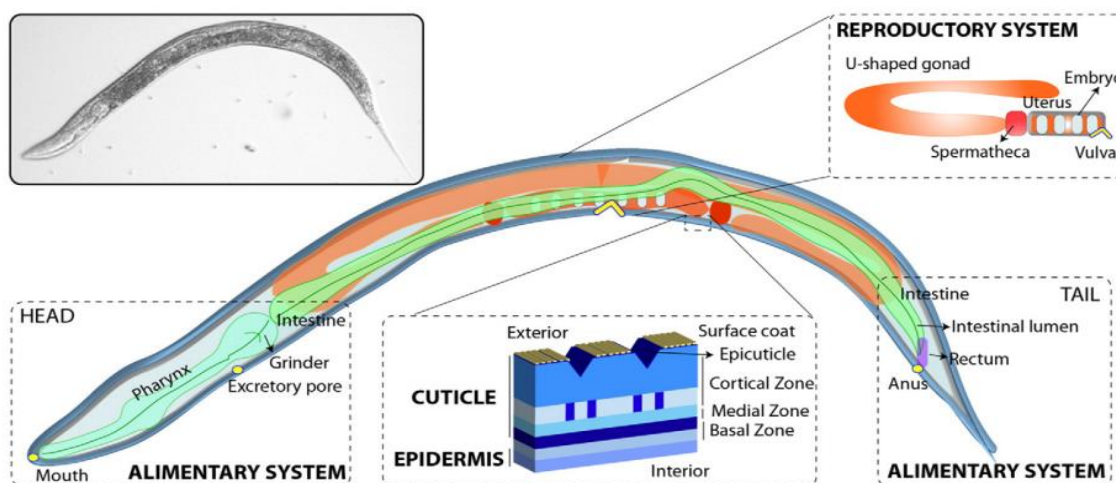
Fonte: Adaptado de Surco (2011)

2.8.3 Anatomia

Ambos os sexos têm uma mesma anatomia geral e são de tamanho semelhante, o adulto masculino é um pouco menor e mais magro do que o hermafrodita (Figura 16). A boca

está na ponta da cabeça, enquanto o ânus da hermafrodita e a cloaca do macho são ventrais na extremidade posterior. Em contraste com a simple ponta da cauda do hermafrodita, a cauda do macho é uma estrutura elaborada com músculos complexos e nervos associados necessários para o acasalamento. A distinção entre ambos os sexos é feita com base nas diferenças na cauda, o sistema digestivo consta de uma faringe e um intestino, que se estende da cabeça para a cauda. A faringe é composta de 20 células musculares, 20 células nervosas e 18 células epiteliais e é fechada em uma membrana basal. Através de contrações musculares coordenadas, a faringe é responsável pela ingestão de bactérias, a bactéria que atravessa o moinho na lâmpada terminal e passa o alimento para o intestino através da válvula faríngeo-intestinal. O intestino é um tubo grosso de estrutura aparentemente simples, com 20 células simples organizadas em 9 anéis (GONZALEZ-MORAGAS; ROIG; LAROMAINE, 2015).

Figura 17 - Anatomia do *C. elegans* (Na parte superior esquerda, imagem de microscópio de luz de *C. elegans*. Abaixo, uma representação esquemática da anatomia de *C. elegans* mostrando as partes de interesse para a avaliação de nanopartículas)



Fonte: Adaptado de Gonzalez-Moragas, Roig e Laromaine 2015).

2.8.3.1 Cutícula e epiderme

A cutícula é a superfície extracelular resistente do verme, que protege o animal do meio ambiente, mantém a morfologia e integridade do corpo, e tem um papel crítico na locomoção por atuação como um esqueleto externo (Figura 17). A cutícula adulta é aproximado de 0,5 μm de espessura e compreende cinco camadas com base principalmente em colágeno, lipídios e algumas glicoproteínas. Nos humanos, a pele é composta por três camadas primárias; epiderme, derme e hipoderme. Funciona como uma barreira protetora para o ambiente semelhante a cutícula de *C. elegans*. Assim, a cutícula e o sistema epitelial de *C.*

elegans podem ser usados como um modelo simplificado de pele (epiderme) para avaliação de Nano Partículas (NPs) para estudar possíveis efeitos adversos e avaliar a adsorção ou mecanismos de absorção de NPs (GONZALEZ-MORAGAS; ROIG; LAROMAIN, 2015).

2.8.3.2 Sistema alimentar

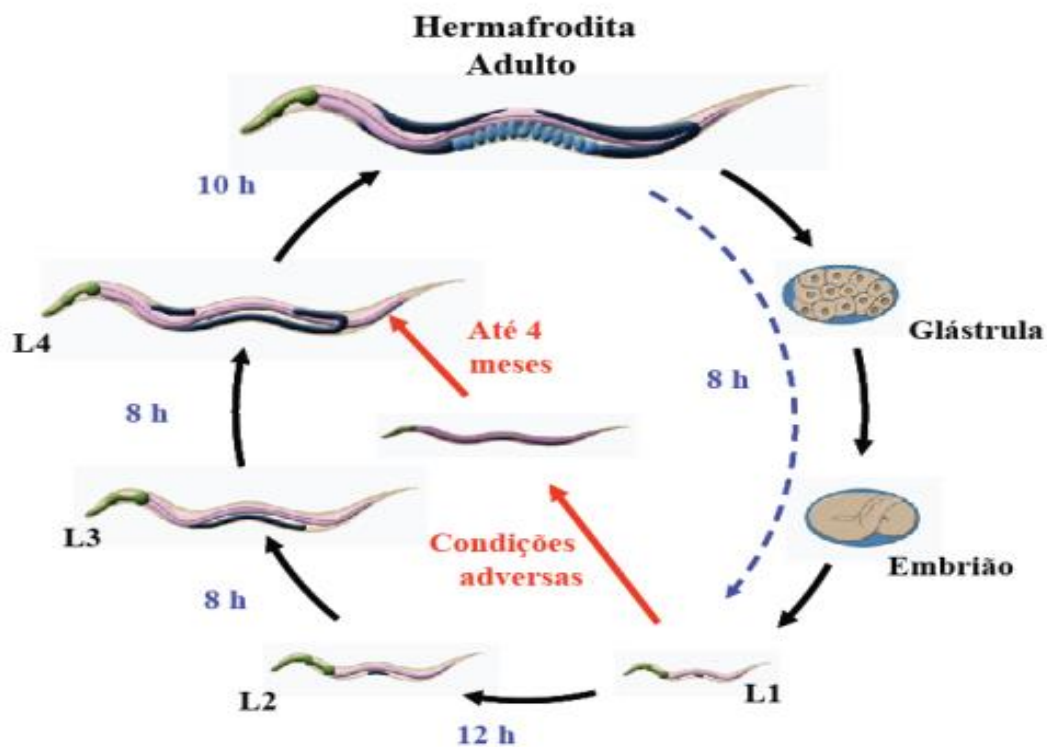
A alimentação de *C. elegans* envolve ingestão de alimentos, digestão, absorção de nutrientes e defecação. O metabolismo também está intimamente relacionado com o processo alimentar. A alimentação do *C. elegans* depende da ação da faringe, uma bomba neuromuscular que liga a boca ao intestino. O músculo da faringe capta o alimento e leva até o intestino. Ele faz isso através de uma combinação de dois movimentos, bombeamento e peristaltismo. Durante o bombeamento na alimentação normal o seu tempo é controlado por dois tipos de neurônios motor da faringe, já o peristaltismo depende de um terceiro tipo de neurônio motor. O sistema nervoso faríngeo contém 20 neurônios de 14 tipos diferentes. Neurônios faríngeos contêm neuropeptídeos e neurotransmissores, os mais importantes neurotransmissores são a acetilcolina, o glutamato e a serotonina. O intestino é um dos principais órgãos do *C. elegans*, responsável pela digestão e assimilação dos alimentos, bem como a síntese e armazenamento de macromoléculas. Além disso, o intestino está emergindo como um sistema experimental para estudar fenômenos biológicos como o tráfico vesicular, relógios bioquímicos, respostas aos 26 estresse e envelhecimento. O programa motor de defecação do *C. elegans* coordena os eventos que ocorrem no intestino, em músculos, principalmente entéricos e em neurônios (OLIVEIRA, 2016).

2.8.4 Sistema modelo *Caenorhabditis elegans* para pesquisas

C. elegans é um importante modelo animal empregado em várias áreas de pesquisas, sua fácil manipulação genética, este organismo possui uma série de características que o tornam muito eficiente como modelo genético: é fácil de cultivar e possui um ciclo de vida curto. O *C. elegans* é facilmente cultivado em laboratório em placas de petri contendo ágar semeadas com a bactéria *Escherichia coli* como alimento. Os vermes atingem a maturidade com 2,5 dias a 25° C e tem um tempo de vida curto de aproximadamente 21 dias a 25°C. O ciclo de vida do animal consiste de um período de desenvolvimento embrionário dentro do ovo, quatro estágios larvais e finalmente o adulto. O ciclo de vida deste organismo inicia-se como uma única célula, que dá origem, através de divisões celulares repetidas, há

558 células que formam o pequeno verme dentro da casca do ovo. Após eclodir, divisões posteriores resultam no crescimento e na maturação sexual do verme. Após a muda final, o verme adulto hermafrodita começa a produzir os seus próprios ovos. Em condições adversas, tais como escassez de alimento ou estresse oxidativo, a larva L1 (entre 8-12 horas de vida) de *C. elegans* pode entrar em um estágio alternativo de diapausa. Neste estado, os animais são hipometabólicos e altamente resistentes ao estresse, com capacidade de sobreviver por longos períodos de várias semanas até meses, como se apresenta na Figura 18. Outra característica importante é que o *C. elegans* é pequeno e transparente, permitindo que suas células possam ser acompanhadas individualmente e que os genes repórteres ligados a proteína fluorescente verde (GFP) possam ser observados no organismo ao vivo (HELLMCKE; AVILA; ASCHNER, 2010; LEUNG et al., 2008).

Figura 18 - Ciclo de vida do *C. elegans*



Fonte: Adaptado de Kaletta e Hengartner (2006)

A anatomia de *C. elegans* inclui os seguintes sistemas: um sistema alimentar, um sistema reprodutivo, um sistema nervoso e um sistema excretor totalmente protegido pela cutícula. *C. elegans* não tem um sistema circulatório, e depende da difusão passiva no fluido pseudocoelômico para o transporte de O₂, CO₂ e nutrientes. Aqui, descrevemos algumas partes da anatomia de *C. elegans*, sua estrutura e composição, e enfatizamos semelhanças com

os seres humanos (GONZALEZ-MORAGAS; ROIG; LAROMAIN, 2015). O ciclo da vida do *C. elegans* é rápido: a 25 °C, a embriogênese dura 14 h e o desenvolvimento pós embrônico para adulto duram 36 h. O desenvolvimento pós embrônico progride através de quatro estádios larvais conhecidos como L₁, L₂, L₃ e L₄ antes de se tornarem adultos. Os estoques de *C. elegans* podem ser mantidos melhor a 16-25 °C, tipicamente a 20 °C. A taxa de crescimento difere em diferentes temperaturas: o crescimento é 2,1 vezes mais rápido a 25 °C e 16 °C e 1,3 vezes mais rápido a 20 °C e 16 °C. As placas de estoque podem ser mantidas por meses, mesmo com o escasso suprimento de alimentos, porque *C. elegans* pode entrar em um estágio larvário alternativo, chamado “dauer”, que é adaptado para sobreviver em condições ambientais severas (Figura 20). A capacidade de controlar o ciclo de vida e o desenvolvimento de *C. elegans* como função da temperatura e do tempo permite o uso de vermes em estádios de desenvolvimento específicos de ovos a larvas ou adultos, o que representa todo o ciclo de vida de apenas duas ou três semanas. Esse controle possibilita estudar a exposição crônica ou aguda de *C. elegans* aos micro-nanopartículas, estimar como o envelhecimento do verme afeta a captação dos encapsulados, degradação e toxicidade e extrapola para o processo de envelhecimento em seres humanos (GONZALEZ-MORAGAS; ROIG; LAROMAIN, 2015).

2.8.5 Avaliação da teoria do estresse oxidativo em *C. elegans*

Conforme a teoria do estresse oxidativo do envelhecimento, as biomoléculas danificadas por oxidações se acumulam com a idade em *C. elegans*. As cepas de vida longa são resistentes a outros tipos de estresse que o estresse oxidativo, como calor, UV e bactérias patogênicas. Vários estudos mostram que a resistência ao estresse oxidativo melhorada não é essencial para o tempo de vida prolongado em estirpes de longa duração. A abordagem mais conclusiva para testar a relação entre ROS e envelhecimento é mudar o sistema antioxidante de defesa e examinar o efeito sobre o envelhecimento. As defesas antioxidantes podem ser alteradas por meio de genética ou intervenções farmacológicas. Nos últimos anos, há evidências crescentes sobre a teoria do estresse oxidativo do envelhecimento em *Caenorhabditis elegans*. Muitos estudos de intervenção que alteraram seu sistema antioxidante foram realizados e a maioria deles não conseguiu suportar essa teoria. Gradualmente, tornou-se claro que um aumento geral no estresse oxidativo não limita a vida neste organismo modelo. No entanto, nas condições estressantes do seu habitat natural, a resistência ao estresse oxidativo pode ser importante para garantir uma vida e reprodução

normais. Embora não se possa descartar que os alvos específicos (proteínas, lipídios ou ácidos nucleicos) acumulam algum tipo de dano ao longo da idade e, assim, contribuem para o processo de envelhecimento, um aumento global do dano oxidativo não é claramente um fator importante que determina a vida útil. Em contraste, há uma crescente evidência de que a sinalização do estresse oxidativo e redox pode ser importante no processo de envelhecimento e que o estresse oxidativo pode exercer funções essenciais no metabolismo. No entanto, para compreender completamente os mecanismos de sinalização de estresse oxidativo e redox, é crucial que os detalhes moleculares, a localização e a regulação das espécies específicas de oxigênio reativo envolvidas possam ser analisadas com precisão. Isso permitirá uma validação crítica das últimas teorias de envelhecimento que tentam explicar a correlação entre estresse oxidativo e envelhecimento. Para este fim, o recente desenvolvimento e implementação de biossensores codificados geneticamente é uma ferramenta promissora que acreditamos que será altamente valiosa para explorar ainda mais estresse oxidativo e biologia redox no envelhecimento *C. elegans* (VAN, HEKIMI, 2010)

2.8.6 Trabalhos sobre avaliação do estresse oxidativo e longevidade em *C. elegans*

Silva et al. (2016), utilizaram os nematóides do *C. elegans* para estudos “in vivo” e demonstraram o efeito do estresse oxidativo e longevidade, quando foram ministradas doses de concentrações de 100 mg/mL de extrato de açaí ricos em conteúdo de antocianinas. Como resultado observaram que se estende o tempo de vida de *C. elegans* e se reduz o estresse oxidativo. Essas descobertas fornecem alguns mecanismos subjacentes novos dos compostos fenólicos sobre o antienvelhecimento, o que implica que pode servir de estratégia para ajudar a melhorar a saúde humana.

Zhang et al. (2009), estudaram o galato de epigallocatequina (EGCG), principal ingrediente ativo do chá verde considerado benéfico em associação com anticarcinogênese, antiobesidade e redução da pressão arterial. Relata-se que EGCG prolongou a longevidade de *Caenorhabditis elegans* sob estresse e melhorou a média da longevidade em 13,1% na concentração de 0,1 µg/mL, 8,0% na concentração de 1,0 µg/mL e 11,8% na concentração de 10,0 µg/mL. Sob o estresse oxidativo, EGCG poderia melhorar a longevidade média de *C. elegans* em 172,9% na concentração de 0,1 µg/ml, 177,7% na concentração de 1,0 µg/ml e 88,5% na concentração de 10,0 µg/ml.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G.; FESSI, H. Investigation of nanocapsules stabilization by amorphous excipients during freeze-drying and storage. **Eur J. Pharm Biopharm**, v. 63, n. 2, p. 87-94, 2006.

AGUIL, M. T. **Caracterização físico-química, química e sensorial de frutos e vinhos da cv Patrícia (*Vitis labrusca* L.)**. 2005. 80f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos)-Universidade federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil, 2005.

AHMAD, S. F.; ZOHEIR, K. M. A.; ABDEL-HAMIED, H. E.; ASHOUR, A. E.; BAKHEET, S. A.; ATTIA, S. M.; ABD-ALLAH, A. R. A. Grape seed proanthocyanidin extract has potent anti-arthritic effects on collagen induced arthritis by modifying the T cell balance. **International Immunopharmacology**, v. 17, p. 79–87, 2013.

ALASALVAR, C. E.; GRIGOR, J. M.; ZHANG, D.; QUANTICK, P. C.; SHAHIDI, F. Comparison of volatiles, phenolics, sugars, antioxidant vitamins, and sensory quality of different colored carrot varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p. 1410–1416, 2001.

ANASTASIADI, M.; PRATSINIS, H.; KLETSAS, D.; SKALTSOUNIS, A. L.; HAROUTOUNIAN, A. Grape stem extracts: Polyphenolic content and assessment of their *in vitro* antioxidant properties. **Food Science and Technology**, v. 48, p. 316–322, 2012.

APOSTOLOU, A.; STAGOS, D.; GALITSIOU, E.; SPYROU, A.; HAROUTOUNIAN, S.; PORTESIS, N.; TRIZOGLOU, I.; HAYES, A. W.; TSATSAKIS, A. M.; KOURETAS, D. Assessment of polyphenolic content, antioxidant activity, protection against ROS-induced DNA damage and anticancer activity of *Vitis vinifera* stem extracts. **Food and Chemical Toxicology**, v. 61, p. 60–68, 2013.

ARORA, S.; RAJWADE, J. M.; PAKNIKAR, K. M. Nanotoxicology and in vitro studies: the need of the hour. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 258, n. 2, p. 151-165, 2012.

ARVANITOYANNIS, I.; LADAS, D.; MAVROMATIS, A. Wine waste treatment methodology. **International Journal of Food Science & Technology**. v. 41, p. 1117-1151, 2006.

AUGUSTIN, M. A.; HEMAR, Y. Nano- and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. **Chemical Society Reviews**, London, v. 38, p. 902–912, 2009.

AZEREDO, H. M. C. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. **Alimentos e Nutrição**, Araraquarav. 16, n. 1, p. 89-975, 2005.

BANSODE, S. S.; BANARJEE, S. K.; GAIKWAD, D. D.; JADHAV, S. L.; THORAT, R. M. Microencapsulation: a review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 1, n. 2, p. 38-43, 2010.

BEHLING, E. B.; SENDÃO, M. C.; FRANCESCATO, H. D.; ANTUNES, L. M.; BIACHI, M. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.

BOO, E.E.; FILHO, R. M.; TOLEDO, E. C; B. Freeze drying porcess: real time model and optimization. **Chemical Engineering and Processing**, v. 43, p. 1475-1485, 2004.

BRENES, A.; VIVEROS, A.; CHAMORRO, S.; ARIJA, I. Use of polyphenol-rich grape by-products in monogastric nutrition. A review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 211, p. 1–17, 2016.

BUFFO, R. A.; REINECCIUS, G. A.; OEHLERT, G. W. Factors affecting the emulsifying and rheological properties of gum acacia in beverage emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 15, n. 1, p. 53-66, 2001.

BURIN, V. M.; FERREIRA-LIMA, N. E.; PANCERI, C. P.; BORDIGNON-Luiz, M. T. Bioactive compounds and antioxidant activity of *Vitis vinifera* and *Vitis labrusca* grapes: Evaluation of different extraction methods. **Microchemical Journal**, v. 114, p. 155-163, 2014.

CAMPOS, L. M. A. S.; LEIMANN, F. V.; PEDROSA, R. C.; FERREIRA, S. R. S. Free radical scavenging of grape pomace extracts from Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera*). **Bioresource Technology**, v. 99, p. 8413–8413, 2008.

CARARETO, N. D. D.; MONTEIRO, F. E. S.; PESSÔA, P. A.; MEIRELLES, A. J. A. Water actitivity of aqueous solutions of ethylene oxide-propylene oxide block copolymers and maltodextrins. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 27, p. 173-181, 2010.

CATANEO, C. B.; CALIARI, V.; GONZAGA, L. V.; KUSKOSKI, E. M.; FETT, R. Atividade antioxidante e conteúdo fenólico do resíduo agroindustrial da produção de vinho. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n. 1, p. 93-102, 2008.

CHAN, K. W.; IQBAL, S.; KHONG, N. H. M.; BABJI, A. S. Preparation of deodorized antioxidant rich extracts from 15 selected spices through optimized aqueous extraction. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 25, p. 6067-6075, 2011.

CRATER, J. S.; CARRIER, R. L. Barrier properties of gastrointestinal mucus to nanoparticle transport. **Macromol. Biosci.**, v. 10, n. 12, p. 1473-1483, 2010.

CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; CLIFFORD, M. N. Dietary phenolics: Chemistry, bioavailability and effects on health. **Natural Product Reports**, v. 26, p. 1001-1043, 2009.

DESAI, K. G. H.; PARKA, H. J. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. **Drying Technology**, v. 23, n. 7, p. 1361-1394, 2005.

DIAS, M.I. **Cultura *in vitro* e técnicas de microencapsulação: aumento da produção e da estabilidade de compostos bioativos de espécies vegetais**. 2016. 366f. Thesis (Doctorate in Sustainable Chemistry), Faculty of Science University from Porto, Portugal, 2016.

DIXIT, M.; KINI, A. G.; KULKARNI, P. K. Preparation and characterization of microparticles of piroxicam by spray drying and spray chilling methods. **Research in Pharmaceutical Science**, v. 52, n. 2, p. 87-89, 2010.

ELNAGGAR, Y. S. R.; EL-MASSIK, A. M.; ABDALLAH, O. Y.; EBIAN, A. E. R. Maltodextrin: a novel excipient used in sugar-based orally disintegrating tablets and phase transition process. **AAPS Pharm Sci Tech**, v.11 p. 645-651, 2010.

EN-QIN, X.; GUI-FANG, D.; YA-JUN, G.; HUA-BIN, L. Biological Activities of Polyphenols from Grapes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 2, p. 622-646, 2010.

FARIA, H. C. I. T. **Estudo Comparativo de Citotoxicidade e Internalização de Nanopartículas de Ouro com diferentes revestimentos**. 2010. 159f. Dissertação (Mestrado em Toxicologia Analítica) - Universidade do Porto, 2010.

FERNANDES, L.; CASAL, S.; CRUZ, R.; PEREIRA, J. A.; RAMALHOSA, E. Seed oils of ten traditional Portuguese grape varieties with interesting chemical and antioxidant properties. **Food Research International**, v. 50, n. 1, p. 161-166, 2013.

FERNANDEZ, P.; ANDRÉ, V.; RIEGER, J.; KÜHMLE, A. Nanoemulsions formation by emulsion phase inversion. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 251, p. 53-58, 2004.

FRAIGE, K. **Estudo comparativo do perfil metabólico e proteômico de uvas (*Vitis vinifera* L.) durante o processo de maturação utilizando ferramentas bionanalíticas**. 2002. 210f. Tese (Doutor em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

GARRIDO, J.; BORGES, F. Wine and grape polyphenols. A chemical perspective. **Food Research International**. v. 54, p. 1844-1858, 2013.

GEMS, D.; RIDDLE, D. L. Defining wild-type life span in *Caenorhabditis elegans*. **The Journal of Gerontology**, v. 55, p. 393-401, 2000.

GHAFOOR, K.; CHOI, Y. H.; JEON, J. Y.; JO, I. H. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 4988-4994, 2009.

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

GONZÁLEZ-CENTENO, M. R.; ROSSELLÓ, C.; SIMAL, S.; GARAU, M. C.; LÓPEZ, F.; FEMENIA, A. Physico-chemical properties of cell wall materials obtained from ten grape varieties and their By-products: Grape pomace and stems. **LWT Food Science and Technology**, v. 43, p. 1580 - 1586, 2010.

GONZALEZ-MORAGAS, L.; ROIG, A.; LAROMAIN, A. *C. elegans* as a tool for in vivo nanoparticle assessment. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 219, p. 10-26, 2015.

GUENDEZ, R.; KALLITHRAKA, S.; MAKRIS, D. P.; KEFALAS, P. Determination of low molecular weight polyphenolic constituents in grape (*Vitis vinifera* sp.) seed extracts: Correlation with antiradical activity. **Food Chemistry**, v. 89, n. 1, p. 1-9, 2005.

GUILHERME, M. R. **Desenvolvimento de hidrogéis superabsorventes para uso eficiente de água**. 2006. 125f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Estadual de Maringá. Maringá, 2006.

HELLMCKE, K. J.; AVILA, D. S.; ASCHNER, M. Utility of *Caenorhabditis elegans* in high neurotoxicological research. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 32, p. 62-67, 2010.

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.

HOLST, B.; WILLIAMSON, G. Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, p. 73-82, 2008.

ISMAIL, H. I.; CHAN, K. W.; MARIOD, A. A.; ISMAIL, M. Phenolic content and antioxidant activity of cantaloupe (*Cucumis melo*) methanolic extracts. **Food Chemistry**, v. 119, n. 2, p. 643-647, 2010.

IVANOVA, V.; STEFOVA, M.; CHINNICI, F. Determination of the polyphenol contents in Macedonian grapes and wines by standardized spectrophotometric methods. **J. Serb. Chem. Soc.**, v. 75, n. 1, p. 45-59, 2010.

JAFARI, S. M.; ASSADPOOR, E.; HE, Y.; BHANDARI, B. Encapsulation efficiency of food flavours and oils during spray drying. **Drying Technology**, v. 26, n. 7, p. 816-835, 2008.

JARA-PALACIOS, J. M.; HERNANZ, D.; ESCUDERO-GILETE, L. M.; HEREDIA, F. J. Antioxidant potential of white grape pomaces: Phenolic composition and antioxidant capacity measured by spectrophotometric and cyclic voltammetry methods. **Food Research International**, v. 66, p. 150-157, 2014.

KALETTA, T.; HENGARTNER, M. O. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 5, p. 387-399, 2006.

KENNEDY, J. A. Grape and wine phenolics: Observations and recent findings. **Ciencia e Investigación Agraria**, v. 35, n. 2, p. 107-120, 2008.

KENNEDY, J. A.; MATTHEWS, M. A.; WATERHOUSE, A. L. Effect of Maturity and Vine Water Status on Grape Skin and Wine Flavonoids. **Am. J. Enol. Vitic.** v. 53, p. 268-274, 2002.

KILMARTIN, P. A.; REID, D. S.; SAMSON, I. Dielectric properties of frozen maltodextrin solutions with added NaCl across the glass transition. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, p. 1277-1284, 2004.

KUANG, S. S.; OLIVEIRA, J. C.; CREAN, A. M. Microencapsulation as a tool for incorporating bioactive ingredients into food. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 50, n. 10, p. 1913-1918, 2010.

LEUNG, M. C.; WILLIAMS, P. L.; BENEDETTO, A.; AU, C.; HELMMCKE, K. J.; ASCHNER, M.; MEYER, J. N. Review: *Caenorhabditis elegans*: An Emerging Model in Biomedical and Environmental Toxicology. **Toxicological Sciences**, v. 106, n. 1, p. 5-28, 2008.

LLOBERA, A.; CAÑELLAS, J. Dietary fibre content and antioxidant activity of Manto Negro red grape (*Vitis vinifera*): pomace and stem. **Food Chemistry**, v. 101, p. 659-666, 2007.

MAIER, T.; SCHIEBERA, A.; KAMMERERA, D. R.; CARLE, R. Residues of grape (*Vitis vinifera* L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. **Food chemistry**, v. 112, n. 3, p. 551-559, 2009.

MAKRIS, D. P.; BOSKOU, G.; ANDRIKOPOULOS, N. K. Polyphenolic content and in vitro antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts. **Journal of Food Composition And Analysis**, v. 20, n. 2, p. 125-132, 2007.

MARINOVA, D.; RIBAROVA, F.; ATANASSOVA, M. Total phenolics and total flavonoids in bulgarian fruits and vegetables. **Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy**, v. 40, n. 3, p. 255-260, 2005.

MARTINS, E. D.; LEONARDI, R. R.; OLIVEIRA, C. R.; MATSUMOT, F. M. T. Liofilização como alternativa para conservação do leite humano. **Health Sci. Inst.**, v. 29, p. 119-122, 2011.

MELLO, L. M. R.; Da Silva, G. A. Disponibilidade e Características de Resíduos Provenientes da Agroindústria de Processamento de Uva do Rio Grande do Sul: panorama 2014. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho. Comunicado Técnico 155, p. 6, 2015.

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**, Santa Maria, v. 41, n.6, p. 1088-1093, 2011.

MENDES, J. A. S.; PROZIL, S. O.; EVTUGUIN, D. V.; LOPES, L. P. C. Towards comprehensive utilization of winemaking residues: Characterization of grape skins from red grape pomaces of variety Touriga Nacional. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 25–32, 2013.

MONRAND, J. K.; HOWARD, L. R.; KING, J. W.; SRINIVAS, K.; MAUROMOUSTAKOS, A. Subcritical solvent extraction of anthocyanins from dried red grape pomace. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 2862-2868, 2010.

MONTEALEGRE, R. R.; PECES, R. R.; VOZMEDIANO, J. L. C.; GASCUEÑA, J. M.; ROMERO, E. G. Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 687-693, 2006.

MOSQUEIRA, V. C F.; LEITE E. A.; BARROS C. M.; VILELA J. M. C.; ANDRADE M. S. Polymeric nanostructures for drug delivery: characterization by atomic force microscopy. *Microscopy & Microanalysis*, v. 1, n.3, p. 36-39, 2005

MOTA, R. V.; SOUZA, C. R.; FAVERO, A. C.; SILVA, S. P.; CARMO, E. L.; FONSECA, A. R.; MURILLO, R. Produtividade e composição físico-química de bagas de cultivares de uva em distintos porta-enxertos. **Pesquisa Agropecuária brasileira**, Brasília, v. 44, n.6, p.576-582, 2009.

NARDOIA, M. **Effect of dietary polyphenol-rich grape byproducts on growth performance, some physiological parameters, meat and meat products quality in chickens academic year. 2015. 244f.** Thesis (Doctorate in science and animal technology)-University of molise, Spanish, 2015.

NIXDORF, S. L.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. Brazilian Red Wines Made from the Hybrid Grape Cultivar Isabel: Phenolic Composition and Antioxidant Activity. **Analytica Chimica Acta**, v. 659, p. 208-215, 2010.

OLIVEIRA D. A.; SALVADOR, A. A.; SMÂNIA, E. F. A.; MARASCHIN, M.; FERREIRA, S. R. S. Antimicrobial activity and composition profile of grape (*Vitis vinifera*) pomace extracts obtained by supercritical fluids. **Journal of Biotechnology**, v. 164, p. 423–432, 2013.

OLIVEIRA, V. E. **Potencial neurotóxico do alumínio como modelo da doença de alzheimer em *Caenorhabditis elegans*.** 2016. 50f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Chapecó, 2016.

PANCERI, C. P.; GOMES, T. M.; GOIS, J. S.; BORGES, D. L. G.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Effect of dehydration process on mineral content, phenolic compounds and antioxidant activity of Cabernet Sauvignon and Merlot grapes. **Food Research International**, v. 54, p. 1343–1350, 2013.

PETERS, R.; KRAMER, E.; OOMEN, A.; HERRERA-RIVERA, Z.; OEGEMA, G.; TROMP, P. Presence of nano-sized silica during in vitro digestion of foods containing silica as a food additive. **ACS Nano**, v. 6, n. 3, p. 2441-2451, 2012.

PINELO, M.; ARNOUS, A.; MEYER, A. S. Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. **Trends in Food Science and Technology**, v. 17, n. 11, p. 579-590, 2006.

POLAK, R.; PIOTOMBO, R. N. M. Care during freeze-drying of bovine pericardium tissue to be used as a biomaterial: A comparative study. **Cryobiology**, v. 63, p. 61-66, 2011.

RIBEIRO, T. P. **Maduração, qualidade, compostos bioativos e atividade antioxidante de uvas americanas e dos sucos elaborados no Submédio do Vale do São Francisco.** 2011. 137f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2011.

RIZZON, L. A.; MIELE, A. Características analíticas de vinhos Merlot da Serra Gaúcha. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 39, n. 6, p. 1913-1916, 2009.

ROBBINS, R. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. **J. Agric. Food Chem.** v. 51, p. 2866-2887, 2003.

ROESLER, R.; GOMES, L.; CARRASCO, L. C.; BARATA, R.; SOUSA, C. A.; ASTORE, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 53-60, 2007.

ROCKENBACH, I.; GONZAGA, L.; RIZELIO, V.; GONÇALVES, A.; GENOVESE, M.; FETT, R. Phenolic compounds and antioxidant activity of seed and skin extracts of red grape (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) pomace from Brazilian winemaking. **Food Research International**, v. 44, p. 897–901, 2011a.

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

SANTOS-GOMES, P. C.; SEABRA, R. M.; ANDRADE, P. B.; FERNANDES-FERREIRA, M. Determination of phenolic antioxidant compounds produced by calli and cell suspensions of sage (*Salvia officinalis* L.). **Journal of Plant Physiology**, v. 160, p. 1025-1032, 2003.

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 Tecnologia Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 3, p. 437-442, 2005.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITA, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Quím. Nova**, v. 26, p. 726-737, 2003.

SHAH, P.; BHALODIA, D.; SHELAT, P. Nanoemulsion: A Pharmaceutical review. **Systematic Reviews in Pharmacy**, v. 01, p. 24-32, 2010.

SHI, J.; YU, J.; POHORLY, J. E.; KAKUDA, Y. Polyphenolics in grape seeds Biochemistry and Functionality. **Journal of Medicinal Food**, v. 6, n. 4, p. 291-299, 2003.

SILVA, M. L. C.; COSTA, R. S.; SANTANA, A. S.; KOBLITZ, M. G. B. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.

SILVA, H.; ROXO, M.; KRSTIN, S.; RÖHRIG, T.; RICHLING, E.; WINK, M. An Anthocyanin-Rich Extract of Acai (*Euterpe precatoria* Mart.) Increases Stress Resistance and Retards Aging-Related Markers in *Caenorhabditis elegans*. **J. Agric Food Chemical**, v. 64, n. 6, p.1283-1290, 2016.

SOUZA, V. B. **Aproveitamento dos subprodutos de vinificação da uva Bordô (*Vitis Labrusca*) para obtenção de pigmentos com propriedades funcionais**. 2013. 122f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

SURCO F. A. **Avaliação da atividade de flavonóides e seus metabolitos no organismo modelo *Caenorhabditis elegans***. 2011. 198f. Tese (Doutorado em alimentação e meio ambiente) - Universidade de Salamanca, Espanha, 2011.

TAKAHASHI, A. I. **Obtenção e caracterização de complexos binários e ternários de sinvastatina e ciclodextrinas**. 2009. 99f. Dissertação (Mestrado em fármacos e medicamentos) - Universidade de São Paulo, São Paulo. 2009

TONON, R. V. **Secagem por atomização do suco de açaí: influência das variáveis de processo, qualidade e estabilidade do produto Matodextrina**. 2009. 121f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de alimentos), Universidade Estadual de campinas-UNICAMP, Brasil, 2009.

TOSCANO, G.; RIVA, G.; DUCA, D.; PEDRETTI, E. F.; CORINALDESI, F.; ROSSINI, G. Analysis of the characteristics of the residues of the wine production chain finalized to their industrial and energy recovery. **Biomass and Bioenergy**, v. 55, p. 260-267, 2013.

VAN, J. M.; HEKIMI, S. Reactive oxygen species and aging in *Caenorhabditis elegans*: causal or casual relationship. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 13, n. 12, p. 1911–1953, 2010.

VENTURINI, C. G.; JÄGER, E.; OLIVEIRA, C. P.; BERNARDI, A.; BATTASTINI, A. M.; GUTERRES, S. B.; POHLMANN, A. Formulation of lipid core nanocapsules. **Colloids. and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 375, n. 1 -3, p. 200-208, 2011.

WALCZAK, A.; FOKKINK, R.; PETERS, R.; TROMP, P.; HERRERA-RIVERA, Z.; RIETJENS, I. Behavior of silver nanoparticles and silver ions in an in vitro human gastrointestinal digestion model. **Nanotoxicology**, v. 7, n. 7, p. 1198-1210, 2013.

WANG, Y. J.; WANG, L. Structures and properties of commercial maltodextrins from corn, potato and Rice starches. **Starch-Starke**, v.52, p. 296-304, 2000.

WILLIAMSON, G.; MANACH, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81 p. 243S–245S, 2005.

WILSON, N.; SHAH, N. P. Microencapsulation of vitamins. **ASEAN Food Journal**, v. 14, n. 1, p. 1-14, 2007.

XIA, E. Q.; DENG, G. F.; GUO, Y. J.; LI, H. B. Biological Activities of Polyphenols from Grapes. **Int. J. Moleculas Science**, v. 11, p. 622-646, 2010.

XU, C.; ZHANG, Y.; CAO, L.; LU, J. Phenolic compounds and antioxidant properties of different grape cultivars grown in China. **Food Chemistry**, v. 119, p.1557-1565, 2010.

ZHANG, L.; JIE, G.; ZHANG, J.; ZHAO, B. Significant longevity-extending effects of EGCG on *Caenorhabditis elegans* under stress. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 46, p. 414–421, 2009.

CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

APRESENTAÇÃO

As atividades experimentais da tese, referentes à avaliação físico-química, as bioatividades *in-vitro* dos artigos I, II e III, foram desenvolvidas no Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA) da Escola de Química e Alimentos (EQA) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). Os experimentos *in-vivo* utilizando nematóides *Caenorhabditis elegans*, referentes à análise de estresse oxidativo e longevidade, foram desenvolvidos no Laboratório do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Rio Grande-FURG. Desta forma, o presente estudo foi dividido em três artigos científicos:

- ARTIGO I - Caracterização física-química, fenólica e atividade antioxidante de diferentes resíduos da vinificação (*Vitis vinifera* L.).
- ARTIGO II – Estudo da extração de fenólicos e *trans*-resveratrol, e avaliação da atividade antioxidante dos extratos dos resíduos da vinificação.
- ARTIGO III - Avaliação física, química e biológica de nanocápsulas de extratos fenólicos de resíduos da vinificação.

ARTIGO I

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICA-QUÍMICA, FENÓLICA E ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE DE DIFERENTES RESÍDUOS DA VINIFICAÇÃO (*Vitis vinifera* L.)**

RESUMO

Este estudo teve como objetivo determinar as características físico-químicas, conteúdo de antocianinas, fenólicos totais, flavonóides totais e a capacidade antioxidante nos resíduos da vinificação das uvas tintas (*Vitis vinífera* L.) em suas variedades: Merlot, Shiraz, Pinot Noir e Cabernet Sauvignon. A amostra coletada foi bem misturada, triturada e homogeneizada em um liquidificador. Parte do estudo foi realizado por meio de análises físico-químicas aplicados nos resíduos, sendo elas pH, sólidos solúveis, acidez, umidade, cinzas, lipídios, proteína, fibra bruta e valor energético. Os resíduos apresentaram um pH ótimo para sua conservação como biomassa, um elevado conteúdo de fibra, um valor significativo de proteínas influenciado por seu conteúdo de nitrogênio provavelmente proveniente da fertilização dos cultivos da uva e um interessante conteúdo energético sendo o mais baixo da variedade Pinot Noir com 205,4 Kcal/100 g em massa seca. As antocianinas totais foram avaliadas quantitativamente sendo o conteúdo mais alto apresentado pelo resíduo da variedade Merlot com $118,93 \pm 0,65$ mg malvidin-3-glicosídeo/100 g de amostra em massa seca. Os compostos fenólicos totais variaram significativamente entre as variedades, e o resíduo Merlot foi o que teve o teor mais alto igual a $3902,54 \pm 8,22$ (mg de ácido gálico)/100 g de massa seca. Por enquanto a variedade Merlot teve o teor mais alto de flavonóides totais equivalente a $89,95 \pm 0,22$ (mg quercetina)/100 g de massa seca. A atividade antioxidante total dos resíduos foi medida pelos métodos de captura de radicais livres 1,1-difenil-2-picrilhidrazil, 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido-sulfônico) e poder redutor. Observou-se que o resíduo da variedade de uva Merlot apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) com os demais resíduos e teve uma maior capacidade antioxidante de $3271,01 \pm 1,61$; $6070,71 \pm 0,05$ (mg equivalente de trolox)/100 g de massa seca e $1,06 \pm 0,05$ de absorbância respectivamente para reduzir Fe^{+3} a Fe^{+2} . O resíduo de uva da variedade Merlot foi o que apresentou o valor mais elevado de antocianinas totais, compostos fenólicos totais e atividade antioxidante.

Palavras-chave: Resíduos de uva. Composição química. Atividade antioxidante. Antocianinas. Fenólicos. Flavonóides.

1 INTRODUÇÃO

Brasil é um país de alta atividade agrícola e é um dos maiores produtores de resíduos agroindustriais, onde os diferentes centros de pesquisa estão procurando novas alternativas para utilizar toda esta matéria orgânica gerada, em uma fonte aproveitável com alto teor agregado. Neste sentido a atividade socioeconômica do cultivo e a industrialização das uvas estão dentro deste contexto, onde a produção de uva no Brasil é utilizada principalmente para a elaboração de vinhos, por quanto o 60% do total de uva da colheita é utilizada na produção de vinhos e de todas as regiões produtoras de uvas o estado de Rio Grande do Sul especificamente a região de serra Gaúcha é a principal zona dedicada à vinicultura é responsável por cerca do 97% da produção nacional de vinhos (LAGO-VANZELA et al., 2011; GOMEZ-PLAZA; MINANO; LOPEZ-ROCA, 2006; ROCKENBACH et al., 2011b).

A espécie mais cultivada entre as uvas no mundo é a *Vitis vinifera*, apresentando grande número de cultivares, entre elas de uvas para vinho, para consumo de mesa e para a produção de passas. As cultivares desta espécie também são conhecidas como uvas europeias ou uvas finas, aproximadamente 70 cultivares compõem o elenco varietal brasileiro de uvas finas para processamento, entre as principais cultivares tintas, pelo volume processado, temos a Cabernet Sauvignon, Merlot, Pinot Noir e Shiraz, mais expressivas no Rio Grande do Sul. A maior produção de uvas no Brasil realiza-se no estado de Rio Grande do Sul, sendo industrializadas 188,5 mil toneladas de uva, com uma quantidade média de 300 milhões de litros de vinho e mosto. Durante este processamento geram-se resíduos formados por casca e sementes e perto de 134 mil toneladas anualmente (CAMPOS, 2008; GOMEZ-PLAZA et al., 2006; ROCKENBACH et al., 2011b).

Da produção de uvas no Brasil, 50 a 60 % são direcionadas para elaboração de vinhos, sucos e outros derivados, sendo que durante o processamento da uva são gerados restos, denominados tecnicamente como resíduos, que podem sólidos ou líquidos, formados principalmente por cascas e sementes. Um grande problema é a quantidade de resíduo que é gerado na elaboração de vinhos. As informações técnicas mencionam que aproximadamente de 100 litros da produção de vinho gera-se 31,7% de resíduos, dos quais 60% são de bagaço, sendo utilizados principalmente como ração animal (CAMPOS, 2008). A uva que é utilizada na indústria alimentícia gera grande quantidade de resíduos de baixo valor econômico utilizadas geralmente como ração animal. Portanto, o aproveitamento deste resíduo como um subproduto de alto teor agregado poderia representar ganhos econômicos significativos e

prevenir ou diminuir os problemas ambientais causados pela acumulação do bagaço da vinificação (CAMPOS et al., 2008; FERREIRA, 2007).

O bagaço obtido da vinificação está composto pela semente, casca e engaço e os restos da polpa da uva, sendo o resultado do esmagamento do grão através de um processo de separação do suco ou mosto. Este resíduo contém grandes quantidades de metabolitos secundários que permanecem nele depois da elaboração do vinho, como antioxidantes, corantes, e outros compostos com altas atividades funcionais (BALASUNDRAM et al., 2006; CAMPOS, 2008; FERREIRA, 2007)

Os subprodutos da vinificação também são caracterizados por elevados conteúdos de compostos fenólicos devido à extração insuficiente durante a vinificação. Os subprodutos obtidos após da vinificação, tanto as sementes como o bagaço, constituem uma fonte barata para a extração de flavonóides antioxidantes, podendo ser utilizados na produção de fitoquímicos (GONZÁLEZ-PARAMÁS et al., 2004). Além disso, as antocianinas são consideradas como potenciais substitutos aos corantes sintéticos devido ao seu brilho, cor atrativa e solubilidade em água, o que permite sua incorporação em uma variedade de matrizes alimentares (BORDIGNON-LUIZ et al., 2007). Nos subprodutos da indústria vinícola, recentes estudos já identificaram e quantificaram a presença dos derivados do ácido hidroxinâmico, como os ácidos cafeico e cumárico; flavonóis (como as antocianinas); e as protocianidinas (ANASTASIADI et al., 2010; AMICO et al., 2008; PASSOS et al., 2007; FLAMINI, 2003; GABETTA et al., 2000; HAYASAKA et al., 2003)

Da composição fitoquímica dos resíduos, a casca e a semente são as principais áreas de acumulação de compostos fenólicos e atividade antioxidante que se concentram nos vacúolos das células da casca; estes compostos tem importantes funções antioxidantes e anti-inflamatórias, que atuam na prevenção de doenças cardiovasculares e cânceres. O bagaço da uva por sua vez é rico em compostos tânicos, os quais apresentam alto potencial nutracêutico e farmacológico (MURGA et al., 2000; WANG; XU, 2007).

Quanto mais intensa é a coloração da uva, mais interessante se torna desde o ponto de vista funcional, os relatórios indicam que as uvas de coloração escura apresentam alto conteúdo de antocianinas, flavonóides, compostos fenólicos assim como alta atividade antioxidante (ABE et al., 2007). Portanto, o objetivo do presente trabalho foi determinar a caracterização físico química, conteúdo de antocianinas, fenólicos totais, flavonóides totais e atividade antioxidante nos resíduos da vinificação da uvas tintas (*Vitis vinífera* L.) em suas variedades: Cabernet Sauvignon, Merlot, Shiraz e Pinot Noir.

2. MATERIAL E MÉTODOS

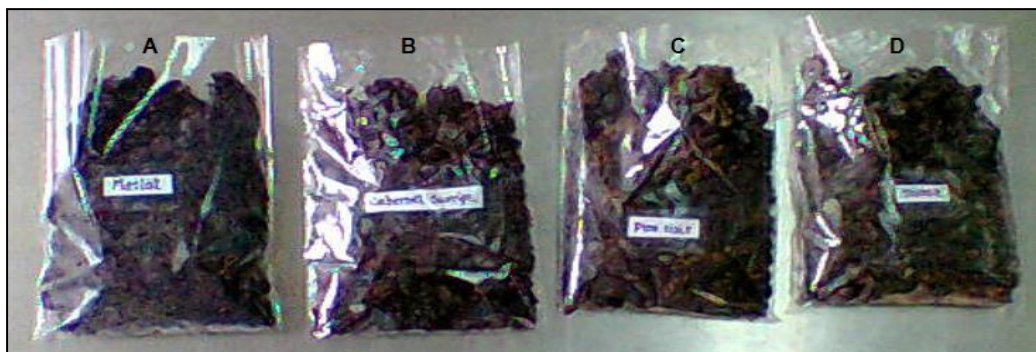
2.1 REAGENTES

Todos os reagentes utilizados são de qualidade analítica e água destilada deionizada foi utilizada em todo o processo.

2.2 AMOSTRAS

As amostras de resíduos de uvas tintas da espécie *Vitis vinifera* L., da vinificação em suas variedades: Merlot, Shiraz, Pinot Noir e Cabernet Sauvignon (Figura 1), foram obtidas depois da operação de pressionar as uvas para obter suco e resíduos, da Indústria de vinhos “Luiz Argenta” em Flores Acunha Caixas do Sul no RS-Brasil, localizado a uma latitude 29°01'44" sul e a uma longitude 51°10'54" oeste, estando a uma altitude de 756 metros sobre o nível do mar, na data 10/03/2014.

Figura 1 - Resíduos de uvas tintas (*Vitis vinifera* L.). (A) Merlot; (B) Cabernet Sauvignon; (C) Pinot Noir; (D) Shiraz.



As amostras foram congeladas e acondicionadas em caixas isotérmicas imediatamente transportadas até o laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA) da FURG, onde foram armazenadas a -18 °C.

2.3 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras de resíduo de uva em cada um de suas variedades foram descongeladas, misturados e esmagadas manualmente com gral e pistilo de porcelana, com a finalidade de expor maiores áreas de contato durante a caracterização dos resíduos.

2.4 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DOS RESÍDUOS

Determinou-se o teor de sólidos solúveis totais, pH e acidez total titulável, das amostras preparadas. Para as análises físico-químicas de pH (pHmetro foi calibrado com os padrões pH 4 e 7), sólidos solúveis totais (°Brix) em refratômetro portátil e acidez total titulável por titulação com NaOH 0,1 N e fenolftaleína como indicador, seguindo os métodos preconizados pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2000)

2.5 COMPOSIÇÃO QUÍMICA PROXIMAL

O teor de umidade, proteínas, lipídeos, fibra bruta e cinzas foram determinados nas amostras preparadas em triplicata seguindo os métodos preconizados pelo Instituto Adolfo Lutz e pela Association of Official Analytical Chemists. e compreenderam: umidade em estufa a 105 °C; cinzas com incineração dupla em bico de Bunsen e mufla (550-600 °C); fibra bruta com desengordurada e incineração (600 °C); proteína pelo método de Kjeldahl; lipídios pelo método de Soxhlet. O carboidrato foi calculado pela diferença entre 100 e a soma das porcentagens de água, proteína, lipídios totais, fibras e cinzas. Para a realização do cálculo do valor calórico total, foram utilizados valores de conversão, alimento/energia, sendo 4 para carboidratos, 9 para lipídios e 4 para proteínas, realizando o somatório desses valores e foi calculado o desvio-padrão dos resultados obtidos (AOAC, 2000).

2.6 DETERMINAÇÃO DE ANTOCIANINAS TOTAIS

O conteúdo de antocianinas totais foi determinado nos resíduos da vinificação das uvas pelo método da diferença de pH, em que se dissolve em dois sistemas-tampão: cloreto de potássio pH 1,0 (0,025 M) e acetato de sódio pH 4,5 (0,4 M), a leitura da absorbância foi realizada a 510 nm, considerando a absorbância máxima para cianidina-3-glicosídeo, e a 700 nm (GIUSTI-WROSLTAD, 2001).

O teor de Antocianinas foi calculado a partir da seguinte Equação:

$$\text{Teor de Antocianinas } \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}}\right) = [(A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}1,0} - (A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}4,5}] \times \text{MM} \times \text{FD} \times 10^3 / (\epsilon \times l) \quad (1)$$

Onde:

A_{510} = Absorbância das amostras lidas a 510 nm

A_{700} = Absorbância das amostras lidas a 700 nm

MM = massa molecular da cianidina 3-glicosídeo 449,2 (g/mol)

FD = fator de diluição, l = Espessura da cubeta (cm)

ϵ = absorvidade molar (26900), que corresponde à cianidina 3-glicosídeo.

2.7 DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS

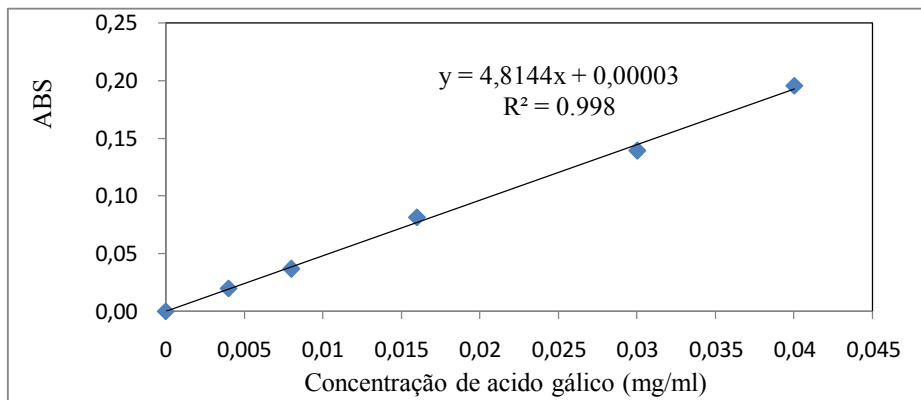
O conteúdo de fenólicos totais (FT) foi realizado conforme o método de Folin-Ciocalteu, que consiste em pesar, aproximadamente, 5 g de amostra, as quais foram trituradas em morteiro, misturou-se com 20 mL de etanol 99,5%, deixando repousar por 18hr coberto com papel de alumínio em ausência de luz sobre refrigeração (5 °C), após realizou-se uma centrifugação de 5000 xg por 15 minutos. Em seguida separou-se do sobrenadante 0,5 mL desse extrato em um tubo de ensaio, ao qual foi adicionado 8 mL de água destilada e 0,5 mL de solução de Folin-Ciocalteu (0,25 M) deixou-se em repouso por 3 minutos, logo adicionou-se 1 mL de solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) 1 M, deixando repousar por 10 minutos. O tubo foi centrifugado (5000 xg por 15 minutos) e mantido no escuro por duas horas, realizando-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 750 nm sobre cubetas de vidro, tendo como branco o etanol e todos os reagentes sem a alíquota da amostra centrifugada. O teor de fenóis totais (FT) foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico e expressos como mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por 100 g de resíduo seco. Todas as análises foram realizadas em triplicata (BUCIC-KOJIC et al., 2007; ZIELINSKI-KOZLOWSKA, 2000)

2.7.1 Curva de calibração dos fenólicos totais

Para a construção da curva de calibração primeiramente, foram preparados 50 mL de solução estoque de ácido gálico em metanol ao 95,5% na concentração de 2 mg/mL, mantida sob refrigeração e protegida da luz. Foram feitas diluições contendo 0, 2, 4, 8, 15, e 20 μL de solução estoque. A curva de calibração foi construída a partir dos valores da absorbância a 750 nm de todas as soluções (0 a 20 $\mu\text{g/mL}$), medidas em cubetas de vidro com percurso óptico de 1 cm. As medidas de absorbância foram efetuadas em triplicata e em

intervalos de 1 min entre cada leitura. A equação da curva de calibração dos fenólicos totais foi $Y = 4,8144X + 0,00003$, onde X corresponde à concentração de fenólicos totais no meio, Y é a absorbância medida no comprimento de onda de 750 nm e o coeficiente de correlação foi de $R = 0,998$. Como observa-se na Figura 2.

Figura 2 - Curva padrão de fenólicos totais



2.8 DETERMINAÇÃO DE FLAVONÓIDES TOTAIS

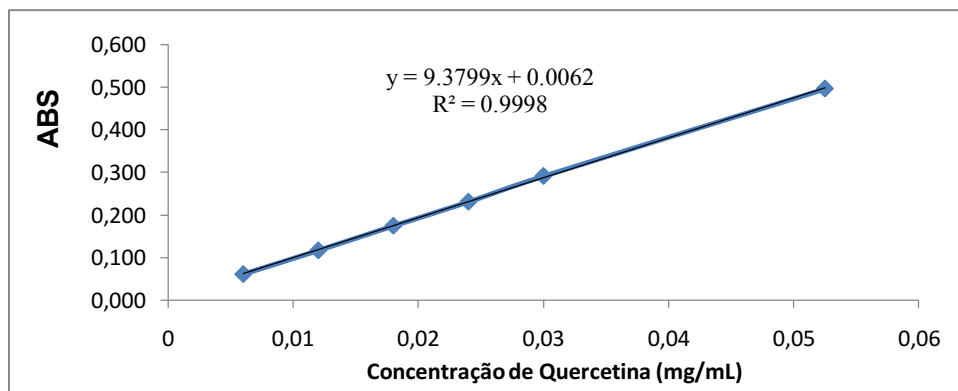
A concentração dos flavonóides totais foi determinada por ensaio colorimétrico usando cloreto de alumínio como agente cromofórico, de acordo com a metodologia descrita por Yang, Martinson e Liu (2009), alíquotas de 250 μ L de cada amostra foram misturadas com 1,25 mL de água deionizada. Em seguida acrescentou-se 75 μ L de solução aquosa de nitrito de sódio (NaNO_2) a 5% e agitados em vórtex. Após 5 min, 150 μ L de solução aquosa de cloreto de alumínio (AlCl_3) a 10% foram adicionados e as soluções homogeneizadas. Após 6 min, 0,5 mL de solução aquosa de NaOH a 1,0 M foram adicionados e o volume completado para 3,0 mL com água deionizada. As soluções foram agitadas e as absorbâncias foram medidas a 510 nm, tendo como “branco” o metanol e todos os reagentes, menos as amostras. Todas as amostras foram preparadas em triplicata e em ambiente escuro.

2.8.1 Curva de calibração dos flavonóides totais

Para a construção da curva de calibração foram preparados 20 mL de solução estoque de quercetina em metanol ao 95,5% na concentração de 3 mg/mL, mantida sob refrigeração e protegida da luz. Foram feitas diluições de 0, 20, 40, 80, 100, e 175 μ L. A

curva foi construída a partir dos valores da absorbância a 510 nm de todas as soluções (0,006 a 0,0525 mg/mL), medidas em cubeta de vidro com percurso óptico de 1 cm.

Figura 3 - Curva padrão de flavonóides totais



As medidas de absorbância foram efetuadas em triplicata. A equação da curva de calibração dos flavonóides totais foi $Y = 9,3799X + 0,0062$, onde X corresponde à concentração de flavonóides totais, Y é a absorbância medida no comprimento de onda de 510 nm e o coeficiente de correlação foi de $R^2 = 0.9998$. Os resultados foram expressos como mg de EQ (equivalente de quercetina) por g de amostra, como observa-se na Figura 3.

2.9 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE – MÉTODO DPPH

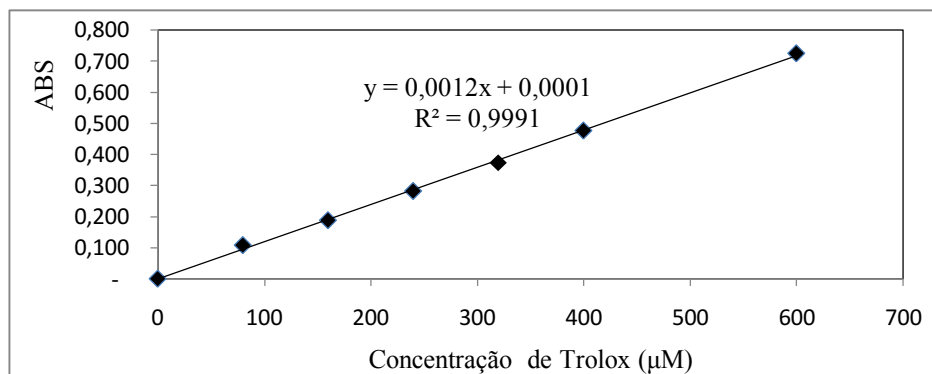
A quantificação da atividade antioxidante foi realizada conforme ao método do radical DPPH descrito por Nenadis et al. (2004). Que consistiu em pesar, aproximadamente, 5 g de amostra, as quais foram trituradas em moedor, misturou-se com 25 mL de metanol a 99,5%, deixando repousar por 20 h coberto com papel de alumínio em ausência de luz solar sobre refrigeração (5 °C), após realizou-se uma centrifugação de 5000 xg durante 25 minutos. Em seguida separou-se o sobrenadante tomando-se 150 µL desse extrato em tubo de ensaio, ao qual foi adicionado 2,85 mL de solução diluída de DPPH e manteve-se em agitação por 15 minutos na ausência da luz. A absorbância foi medida em espectrofotômetro (Kasuki modelo 10UV), em comprimento de onda de 515 nm, utilizando-se cubetas de vidro. A atividade antioxidante foi determinada pelo método de Nenadis et al. (2004) com a interpolação da absorbância das amostras contra uma curva padrão construída com Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) e os resultados foram

expressos em atividade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC) (mg TEAC por 100 g de resíduo seco). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.9.1 Curva de calibração para o método do DPPH

Para a construção da curva de calibração primeiramente, foram preparados 50 mL de solução estoque de Trolox em metanol a 95,5% numa concentração de 2000 $\mu\text{M/mL}$, mantida sob refrigeração e protegida da luz com papel laminado. Foram feitas diluições de 80, 160, 240, 320, 405 e 625 μM . A curva foi construída a partir dos valores da absorbância a 515 nm de todas as soluções, medidas em cubeta de vidro com percurso óptico de 1 cm. As medidas de absorbância foram efetuadas em triplicata. A equação da curva de calibração para a atividade antioxidante foi $Y = 0,0012X + 0,0001$, onde X corresponde à concentração de μM (micro molar) de TROLOX, Y é a absorbância medida no comprimento de onda de 515 nm e o coeficiente de correlação foi de $R = 0,999$. Como observa-se na Figura 4.

Figura 4 - Curva padrão do Trolox, para determinar atividade antioxidante pelo método DPPH



2.10 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE – MÉTODO ABTS

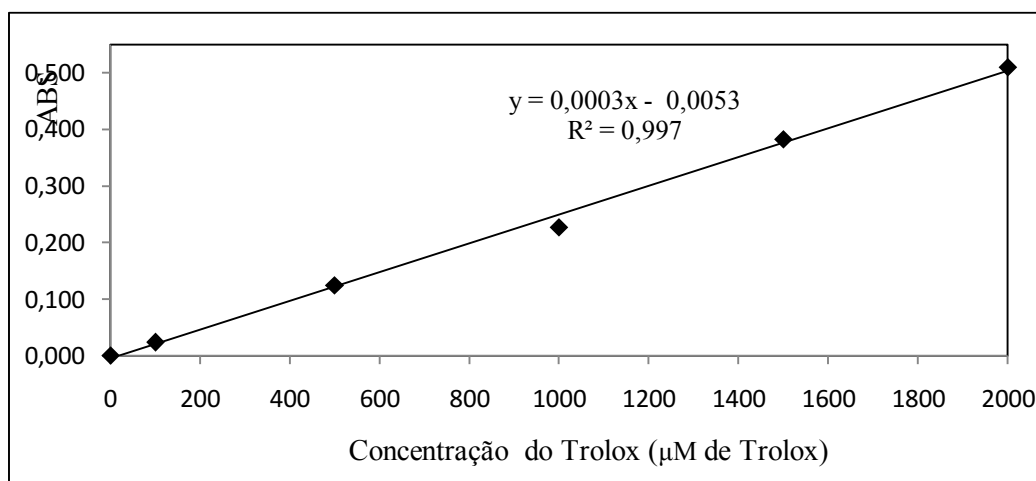
Utilizou-se o método de Kuskoski et al. (2004), o radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$ é formado por uma reação química com 5 mL de solução de persulfato de potássio e 88 μL de uma solução de estoque de ABTS (192 mg de reagente ABTS em 50 mL de água destilada). Uma vez formado o radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$, o mesmo foi diluído em etanol até obter-se uma medida de absorbância de 0,70 ($\pm 0,02$) a um comprimento de onda de 734 nm, a uma temperatura de equilíbrio de 30 $^{\circ}\text{C}$. A absorbância foi medida em espectrofotômetro modelo (Kasuki

10UV), nos tempos 1, 4 e 7 minutos após a adição da amostra. O teor da atividade antioxidante por este método foi determinado por interpolação contra uma curva padrão construída com Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) antioxidante sintético similar à vitamina E e os resultados foram expressos em atividade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC) (mg TEAC por 100 g de resíduo seco). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.10.1 Curva de calibração para o método ABTS

Para a construção da curva de calibração primeiramente, foram preparados 25 mL de solução estoque de Trolox em etanol a 95,5% numa concentração de 2 mM/mL, mantida sob refrigeração e protegida da luz com papel laminado. Foram feitas diluições de 0, 100, 500, 1000, 1500 e 2000 μ M. A curva de calibração foi construída a partir dos valores da absorbância a 515 nm de todas as soluções, medidas em cubetas de vidro com percurso óptico de 1 cm. As medidas de absorbância foram efetuadas em triplicata. A equação da curva de calibração para a atividade antioxidante foi $Y = 0,0003X + 0,0053$, onde X corresponde à concentração de μ M (micro molar) de TROLOX no meio, Y é a absorbância medida no comprimento de onda de 734 nm e o coeficiente de correlação foi de $R = 0,997$. Como observa-se na Figura 5.

Figura 5 - Curva padrão do Trolox para atividade antioxidante pelo método ABTS



2.11 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE - MÉTODO DO PODER REDUTOR

O poder dos extratos de reduzir o íon Fe^{3+} para Fe^{2+} foi determinado pelo método de You-Tung et al. (2015). Um volume de 2 mL de amostra (5mg/mL) foi adicionado em 2 mL de tampão fosfato 0,2 M (pH 6,6) e 2 mL de ferricianeto de potássio (1%). A seguir, a mistura foi incubada a 50 °C durante 20 minutos, e após adicionou-se na reação 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10%. Uma alíquota de 2 mL foi misturada com 2 mL de água destilada e 0,4 mL de cloreto férrico 0,1% em tubos de ensaio. Após 10 minutos de reação a absorbância da solução resultante foi lida a 700 nm em espectrofotômetro UV/VIS (Kasuki modelo 10UV). O aumento da absorbância da reação indicou aumento de poder de redutor. Todas as amostras foram preparadas em triplicata e em ambiente escuro.

2.12 DETERMINAÇÃO DA COR

A determinação dos parâmetros colorimétricos das amostras foi obtida no sistema CIELAB, utilizando colorímetro portátil marca Konica Minolta o qual foi calibrado com placa de porcelana branca (GOMEZ-PLAZA; MINANO; LOPEZ-ROCA, 2006).

2.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados foi realizada pela aplicação da ANOVA e o teste Tukey visando identificar diferenças significativas entre as médias, usando o software Statistica® 6,0. O nível de significância considerado para a diferença entre as médias foi de 5 % ($p < 0,05$). Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS NOS RESÍDUOS DE DIFERENTES VARIEDADES DE UVA PROCEDENTES DA VINIFICAÇÃO.

Os resultados obtidos a partir da caracterização físico-química realizada para os resíduos de uva procedentes da vinificação apresentam-se na Tabela 1 e Figura 6. Os valores

de pH encontrados nos resíduos de uva mostraram que a variedade Pinot Noir teve o valor mais alto em relação às demais variedades, por enquanto apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) frente as variedades Cabernet Sauvignon e Merlot, sendo que a variedade Merlot teve o menor valor de pH. Estes valores estiveram na mesma faixa dos reportados por Abe et al. (2007). Além dos valores baixos de pH estas são parâmetros que influenciam na conservação dum alimento, foi assim que os resíduos de uva pelo seu valor de pH estiveram dentro deste contexto (LAFKA; SINANOGLU; LAZOS, 2007; CHAVES et al., 2004).

Sobre os valores de acidez não existiu diferença significativa ($p < 0,05$) entre as variedades Shiraz e Merlot, assim como nas variedades Pinot Noir e Cabernet Sauvignon, entretanto o valor da acidez dos resíduos foi um pouco mais alto em comparação com a acidez das bagas de Cabernet Sauvignon e Alicante (1,8 e 1,3 mg ac. Tartárico/mL) respectivamente, determinadas por Da Silva et al. (2010). Estes resultados devem-se provavelmente a que os resíduos continham pouca quantidade de água e sua expressão da acidez foi representada pela presença da casca e semente da uva, as quais tem um conteúdo alto de ácidos orgânicos solúveis que foram responsáveis de sua acidez (DA MOTA et al., 2009).

Tabela 1 - Teores de pH, sólidos solúveis e acidez total nos resíduos de diferentes variedades de uva procedentes da vinificação*.

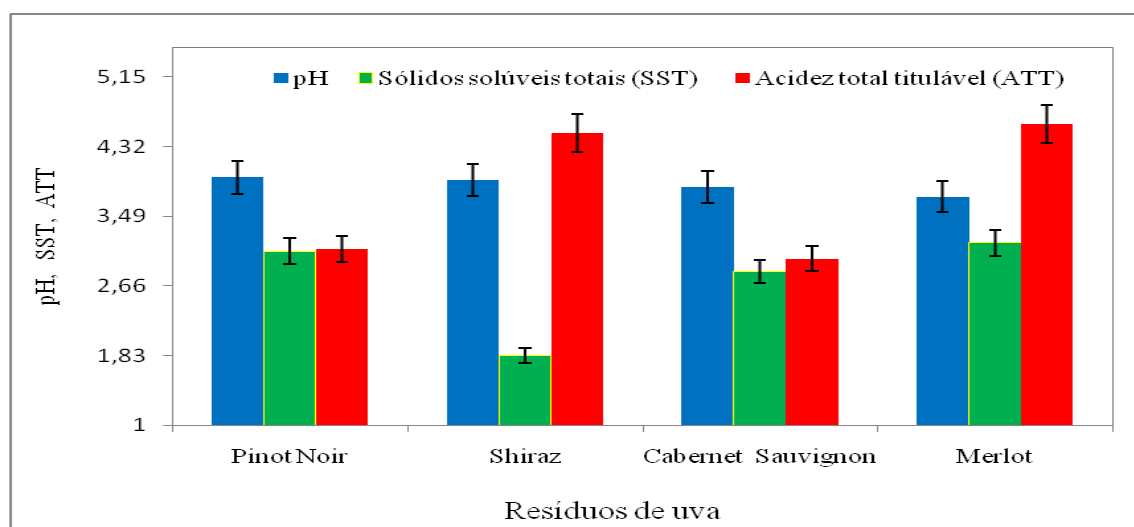
Variedades de resíduos de uva		Sólidos solúveis totais (SST) ($^{\circ}$ Bx)	Acidez total titulável (ATT) (mg ac. Tartárico/mL)
	pH		
Pinot Noir	3,95 $\pm$ 0,01 a	3,07 $\pm$ 0,06 a	3,10 $\pm$ 0,13 b
Shiraz	3,92 $\pm$ 0,02 a	1,83 $\pm$ 0,15 b	4,48 $\pm$ 0,12 a
Cabernet Sauvignon	3,84 $\pm$ 0,03 b	2,83 $\pm$ 0,08 a	2,98 $\pm$ 0,03 b
Merlot	3,72 $\pm$ 0,02 c	3,17 $\pm$ 0,10 a	4,59 $\pm$ 0,14 a

*Os resultados estão expressos na forma de média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$). Médias com letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes no teste de Tukey ($p < 0,05$).

Respeito aos valores dos sólidos solúveis totais, determinou-se que entre as variedades de resíduos de uva; Pinot Noir, Cabernet Sauvignon e Merlot, não houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre sim. Porém a variedade Shiraz foi a única que teve diferença significativa com as demais variedades. Assim mesmo a variedade Merlot teve o valor mais alto de sólidos solúveis totais frente aos demais, essa diferença pode ser atribuída à

característica desta variedade de resíduo de uva já que teve o conteúdo mais alto de umidade, permitindo a solubilidade dos sólidos solúveis no seu médio. Deng, Penner e Zhao (2011) obtiveram resultados semelhantes ao avaliar as características físicas químicas em subprodutos da vinificação da uva Cabernet Sauvignon, Merlot, Pinot noir grape (*V. vinifera*). Da Silva et al. (2010) também obtiveram similares comportamentos em seus resultados sobre as uvas Merlot e bagas das videiras Cabernet Sauvignon e Alicante. Da mesma forma Da Mota et al. (2009) encontraram resultados com a mesma coerência quando estudaram as bagas do cultivar Niágara rosada sobre diferentes porta-enxertos. Estes resíduos apresentaram resultados de pH, e acidez titulável, ótimos para evitar a proliferação de mofo e leveduras, facilitar sua estabilidade físico-química, como um parâmetro importante para garantir sua conservação e ideal para sua utilização no processo industrial (FELDBERG, 2008)

Figura 6 - Teores de pH, sólidos solúveis e acidez total nos resíduos de diferentes variedades de uva procedentes da vinificação.



3.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA PROXIMAL NOS RESÍDUOS DE DIFERENTES VARIEDADES DE UVA PROCEDENTES DA VINIFICAÇÃO

Os resultados obtidos da composição proximal dos resíduos de uva procedentes da vinificação estão apresentados na Tabela 2 e Figura 7. Ao analisar os resultados obtidos determinou-se que para a umidade existiu diferença significativa ($p < 0,05$), entre todas as variedades dos resíduos da vinificação, sendo que o resíduo do Merlot teve o mais alto conteúdo de umidade (59,33%) e Pinot Noir o mais baixo (50,69%). Os valores de umidade

obtidos neste estudo resultaram similares respeito ao bagaço de Cabernet Sauvignon, determinados por Campos (2008), que estiveram no faixa de 64%.

Estes valores indicaram que a amostra de Merlot foi o resíduo mais úmido o que não aconteceu com os demais resíduos, esta característica deveu-se provavelmente ao tipo de prensagem que foi sometida durante o processo da vinificação. O conteúdo de cinzas não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os resíduos Cabernet Sauvignon e Pinot Noir, mas apresentaram diferença significativa com a variedade Shiraz e Merlot, as umidades obtidos neste estudo foram menores aos resíduos (pele e sementes) da vinificação determinado por Lafka, Sinanoglou e Lazos (2007), que foi do 73,6%, respectivamente. O conteúdo das cinzas correspondeu a presença de elementos minerais nos resíduos de uva como o potássio, fósforo, cálcio e magnésio, por enquanto nossos resultados indicam a presença do conteúdo destes minerais nos resíduos da vinificação e que possivelmente pode ser devido à práticas culturais de cultivo das uvas.

O conteúdo de lipídios não apresentou diferença significativa para ($p < 0,05$), entre os resíduos Cabernet Sauvignon e Pinot Noir, assim mesmo estes tiveram diferenças significativas com o resíduo Merlot e Shiraz, por enquanto o resíduo do tipo Pinot Noir é o que chegou a ter um teor relativamente mais baixo que os demais resíduos de 1,92%, entretanto o resíduo de Merlot foi o que teve o valor mais alto de 3,31% de lipídios, respectivamente. Estes resultados foram menores aos obtidos por Sáyago-Ayerdi et al. (2009) em bagaço uvas tintas (7,7%). Outros trabalhos obtiveram teores muito maiores com respeito a nossos resíduos, obtendo até 13,5% em bagaço de uvas tintas e 9,5% em bagaço de uvas brancas reportados por Llobera e Cañellas (2007). O conteúdo de lipídios está principalmente associado com as sementes da uva, por enquanto nossos resíduos da vinificação contém baixos valores de lipídios e indicando que este teor é devido a que o resíduo está constituído pelas frações de casca e semente, e que a diferença do conteúdo de lipídios estão nos tipos das variedades de uva que contêm menos quantidades de sementes que outros, isso levou a ter menor conteúdo de lipídios em nossas amostras de resíduos de uvas.

O conteúdo de proteína apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) entre todos os resíduos Merlot, Cabernet Sauvignon e Shiraz, por enquanto não tiveram diferença significativa os resíduos Cabernet Sauvignon e Pinot Noir, estes resultados variaram desde o valor mais baixo 13,16% para Merlot até o valor mais alto correspondente ao resíduo Cabernet Sauvignon com 15,83%, entretanto nossos resultados foram superiores aos reportados por Sanchez-Alonso, Sola e Bordeiras (2007) e Sanchez-Alonso et al. (2008) para bagaço de uvas tintas com um 8,1% de proteínas e de 7,3% para bagaço de uvas brancas.

O conteúdo de proteína dos resíduos de uva em todas suas variedades provavelmente estão em função da variedade, do tipo de solo, praticas de cultivo, grão de fermentação, presença de leveduras e da tecnologia da prensagem a que estão submetidos para a produção de vinhos, se acredita que estas características foram os que geraram uma variação em todos os componentes dos resíduos de uva procedente da vinificação (SANCHEZ-ALONZO; SOLA; BORDEIRAS, 2007; YOU-TUNG et al., 2015).

Tabela 2- Teores de umidade, cinzas, lipídios e nitrogênio nos resíduos de diferentes variedades de uva procedentes da vinificação, base seca*.

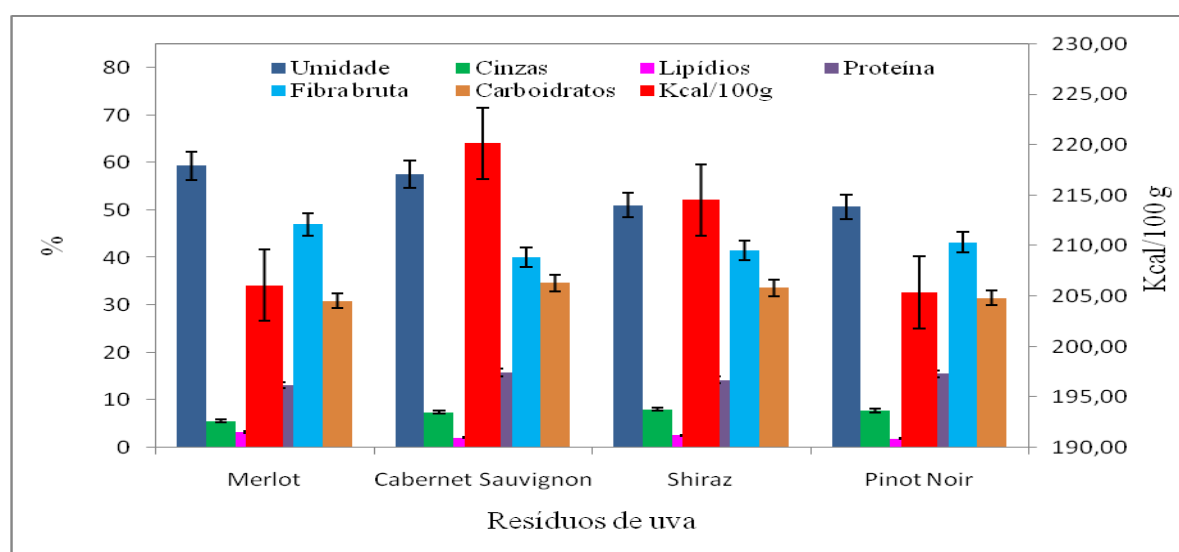
Parâmetros (%)	Cabernet			
	Merlot	Sauvignon	Shiraz	Pinot Noir
Umidade	59,33 ± 0,59 a	57,61 ± 0,62 b	51,02 ± 0,16 c	50,69 ± 0,21c
Cinzas*	5,62 ± 0,53 c	7,45 ± 0,62 b	8,09 ± 0,16 a	7,81 ± 0,21 b
Lipídios*	3,31 ± 0,14 a	2,03 ± 0,20 c	2,59 ± 0,08 b	1,92 ± 0,27 c
Proteína*	13,16 ± 0,51 c	15,83 ± 0,41 a	14,19 ± 0,09 b	15,51 ± 0,48 a
Fibra bruta*	46,99 ± 0,12 a	40,06 ± 0,71 d	41,52 ± 0,62 c	43,24 ± 0,21 b
Carboidratos*	30,92 ± 0,20 d	34,64 ± 0,97 a	33,61 ± 0,74 b	31,52 ± 0,73 c
Kcal/100g	206,07 ± 1,82 c	223,41 ± 2,68 a	214,53 ± 2,38 b	205,38 ± 1,6 d

*Os resultados estão expressos na forma de média ± desvio padrão (n = 3). Médias com letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes no teste de Tukey (p < 0,05).

O conteúdo de Fibra bruta não apresentou diferença significativa (p<0,05) entre os todos os resíduos, teores que variaram desde 40,06% ate 46,99%, entretanto nossos resultados foram superiores aos reportados por Baumgartel et al. (2007) no seu estudo sobre bagaço de uva tinta que foi de 31,2% de fibra bruta. O conteúdo de Carboidratos apresentou diferença significativa (p<0,05) entre todos os resíduos, sendo o Merlot o que teve o valor mais baixo (30,92%) e o resíduo Cabernet Sauvignon apresentou o valor mais alto com 34,64% de Carboidratos em base seca, Esses valores de carboidratos estiveram dentro do intervalo do bagaço de uva (12,2-48,3%) relatado por Brenes et al. (2016). Esta diferença possivelmente ocorreu devido ao alto metabolismo celular durante o desenvolvimento do cultivar submetida a elevados sistemas de produção, sistema orgânico, sendo a composição química da uva definida pelo estágio de maturação, potencial genético, clima e manejo, estando vinculadas às condições de composição aos fatores envolvidos durante o desenvolvimento do fruto (YOU-TUNG et al., 2015).

Respeito ao valor calórico, os resíduos de uva do presente estudo apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre todos os resíduos, por enquanto estiveram muito perto aos reportados por Brenes et al. (2016) que encontraram valores entre (210,1-288,4) kcal, sobre resíduos da vinificação. Demonstrando que esses resíduos têm um baixo teor calórico e podem ser usados como ingrediente na indústria de alimentos a fim de agregar valor e reduzir calorias.

Figura 7 - Composição química e valor calórico dos resíduos de diferentes variedades de uva procedentes da vinificação



3.3 FENÓLICOS TOTAIS, FLAVONÓIDES TOTAIS E ANTOCIANINAS

Os teores de antocianinas totais encontrados nos resíduos da uva procedentes da vinificação foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) entre todas as amostras estudadas conforme pode se observar na Tabela 3 e a Figura 8, sendo que o resíduo de uva da variedade Merlot foi a que teve a maior quantidade de antocianinas equivalente a 118,93 mg malvidin-3-glicosídeo/100 g de amostra, o resíduo que segue em ordem quantitativa foi da variedade Cabernet Sauvignon com um teor de 95,02 mg malvidin-3-glicosídeo/100 g, estas duas variedades de uva são as que tiveram os valores mais altos de antocianinas, o qual pode justificar-se pela sua característica física das amostras que resultaram ser mais vermelhas, estes resíduos apresentaram uma tonalidade de cor vermelhas muito intenso em comparação aos demais resíduos, pigmentos indicativos da presença de antocianinas. Os resíduos das variedades Shiraz e Pinot Noir apresentaram conteúdos mais baixos de antocianinas, na

variedade Shiraz com um teor de 32,66 mg malvidin-3-glicosídeo/100 g, de estas duas ultimas amostras inicialmente apresentaram baixa tonalidade vermelha parâmetro que foi um indicativo do baixo conteúdo de antocianinas, como ficou demonstrado a partir dos resultados apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Conteúdo de antocianinas totais (AT), fenólicos totais (FT) e flavonóides totais (FVT) nos resíduos de diferentes variedades de uvas tintas (*Vitis vinifera* L.), procedentes da vinificação.

Resíduos	AT	FT	FVT	AT / FT
	(mg mv-3-gl/100 g) (b.s.)	(mg GAE/100 g) (b.s.)	(mg QE/100 g) (b.s.)	
Merlot	118,93 ± 0,65 a	3902,54 ± 8,22 a	89,95±0,22 a	0,03 b
Cabernet Sauvignon	95,02 ± 0,47 b	2332,69 ± 7,06 b	21,01±1,74 d	0,04 a
Pinot Noir	47,56 ± 2,46 c	2047,32 ± 6,04 c	47,54±1,66 c	0,02 c
Shiraz	32,66 ± 0,78 d	1911,86 ± 3,68 c	64,64±1,01 b	0,01 d

Resultados são expressos da média ± desvio padrão (n = 3); Médias com letras diferentes na mesma coluna são diferentes no teste de Tukey (p<0,05); mv-3-glc=malvidin-3-glicosídeo; GAE=Equivalente ácido gálico; QE=Quercetina; b.s. =Base seca; AT=Antocianinas totais, FT=Fenólicos totais, FVT= Flavonóides totais

Nossos resultados com respeito a outras pesquisas observou-se que o valor de antocianinas dos resíduos foram menores ao obtido por Rockenbach et al. (2011a) sobre o bagaço de uva Bordô com 1122 mg equivalente de malvidin-3-glicosídeo/100 g de bagaço seco, além com esses resultados foi considerado como uma fonte potencial de pigmento naturais de antocianinas. Comparando com bagas de uva da variedade Shiraz e Merlot estudadas por Abe et al. (2007) encontraram quantidades de antocianinas no ordem de 111,8 e 97,8 mg./100 g equivalentes de cianidina-3-glicosídeo respectivamente, estes valores estiveram dentro da faixa dos obtidos em nosso estudo. Comparados com as cascas de uvas tintas destinados a produção de vinho da variedade Alfrocheiro, Alicante, Aragonez e Amaro, ao respeito Negro et al. (2003) determinaram que os valores de antocianinas estiveram entre 159,72; 160,07; 146,20 e 980 mg malvidin-3-glicosídeo/100 g de casca, respectivamente. As cascas finalmente representam os resíduos da vinificação, neste sentido estes valores foram mais altos aos resíduos de nosso estudo com exceção do resíduo Merlot que teve o valor mais próximo á variedade Aragonez. Da Mota et al. (2010) estudaram o conteúdo de antocianinas nas mesmas variedades e encontraram em Pinot Noir (210 mg malvidin-3-glicosídeo/100 g de casca), Merlot (350 mg malvidin-3-glicosídeo/100 g de casca, Cabernet Sauvignon com (220

mg malvidin-3-glicosídeo/100 g de casca) e Shiraz (7,4 mg malvidin-3-glicosídeo/100 g de casca) em base seca, o que demonstrou que nossos valores resultaram menores. As antocianinas são compostos pertencentes à classe dos flavonóides, que se apresenta como um grupo de pigmentos naturais com estruturas fenólicas variadas, elas são responsáveis das cores azul, violeta e de todas as tonalidades de vermelho que aparecem nas uvas, além de estarem presentes no suco, também são encontradas na casca da uva que formam parte dos resíduos das uvas que se geram durante seu processamento (VOLP et al., 2008; MALACRIDA; MOTTA, 2005).

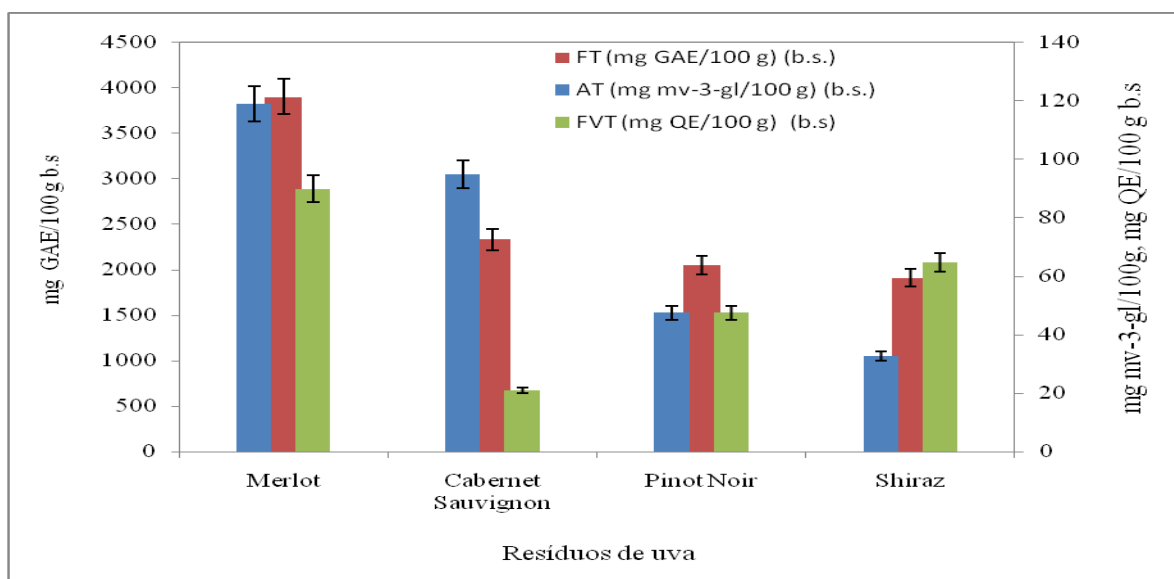
Sobre os valores de fenólicos totais encontrados nos resíduos da uva procedentes da vinificação, determinou-se estatisticamente que existiu diferença significativa ($p < 0,05$) entre os resíduos Merlot Cabernet Sauvignon, Pinot Noir e Shiraz que não se diferenciaram entre si, como pode se observar na Tabela 3. O resíduo de uva da variedade Merlot foi o que apresentou maior quantidade de fenólicos totais equivalente a 3902,54 mg equivalente de ácido gálico/100 g de amostra, as variedades que seguiram em ordem quantitativa foram Cabernet Sauvignon e Pinot Noir com um teor de 2332,69 e 2047,32 mg equivalente de ácido gálico/100 g de amostra, respectivamente, por enquanto dos resíduos estudadas a variedade Merlot teve o conteúdo mais alto de fenólicos totais e a variedade Shiraz teve o conteúdo mais baixo. De estes resultados pode-se argumentar que o conteúdo de fenólicos totais teve relacionado com o conteúdo de antocianinas. Rockenbach et al. (2011a) reportaram valores superiores de fenólicos totais de 7474 mg ácido gálico/100 g de peso seco na variedade de Cabernet Sauvignon, sendo que Llobera e Cañellas (2006) reportaram valores superiores para Cabernet Sauvignon, Pinot Noir e Shiraz, mais inferiores ao resíduo Merlot de 2630 mg ácido gálico/100 g de peso seco na variedade de Manto negro em bagaço de uvas vermelhas respectivamente. Abe et al. (2007) e Soares et al. (2008) obtiveram valores inferiores a nossos resultado quando estudaram o conteúdo de fenólicos totais em bagas de uvas Syrah, Merlot, Isabel e Niágara, com teores de 385, 337, 41,21 e 219,56 (mg equivalentes de ácido gálico/100 g em base seca). Rockenbach et al (2011a) relataram maiores valores de ácido fenólico total, obtendo 7474 mg de ácido gálico/100 g de massa seca em Cabernet Sauvignon. A partir desses resultados, pode-se argumentar que o conteúdo total de fenólicos foi devido ao alto teor de antocianinas e provavelmente à presença de outros ácidos fenólicos, a variabilidade dos resultados deve-se a que foram analisadas em bagas inteiras, ao tipo de solo onde foram cultivadas e as práticas culturais. Assim mesmo Da Mota (2010) ao estudar os fenólicos totais nas cascas de uva, das variedades Pinot Noir, Merlot e Cabernet Sauvignon reportaram 1160, 1210, e 1060 mg equivalente ácido gálico/100 g de

casca em base seca, respectivamente, estes valores foram menores aos resultados deste trabalho. Sobre os flavonóides totais determinou-se que existiu diferença significativa ($p < 0,05$) entre todos os resíduos. por enquanto o resíduo da variedade Merlot foi o que apresentou maior quantidade de flavonóides totais equivalente a 89,95 (mg quercetina/100 g), seguido de Shiraz com 64,64 (mg quercetina/100 g) em base seca. Nossos resultados foram superiores aos reportados por Ruberto et al. (2007) em bagaço de uva Cabernet Sauvignon (1.9 mg de quercetina/100 g de bagaço seco).

As antocianinas compreendem uma fração significativa do conteúdo de fenólicos totais, nos resíduos de Cabernet Sauvignon e Merlot a relação de (AT/PT) apresentou-se mais alta de (0,041 e 0,03), mais a variedade Shiraz foi o que teve o teor mais baixo (0,017).

Por enquanto na Tabela 3 pode-se observar que os resíduos que tem maior concentração de fenólicos totais foram Merlot e Cabernet Sauvignon equivalente a 3902,54 e 2332,69 mg de GAE/100 g respectivamente. Ao respeito Teixeira (2014) encontrou o mesmo comportamento sobre a relação de (AT/PT) como indicativo de alto conteúdo de fenólicos totais durante o estudo das cascas de uvas. Os resíduos de uvas estudadas mostraram alto conteúdo de fenólicos totais no presente estudo, este fato esta relacionada de que os resíduos mostraram uma cor intensa de vermelho-purpura, atribuída á maior quantidade de antocianinas, normalmente associada ao alto valor de fenólicos totais (REBELO et al., 2013).

Figura 8- Teores de antocianinas totais (AT), fenólicos totais (FT) e flavonóides totais (FVT) nos resíduos de diferentes variedades de uva procedentes da vinificação.



3.4 ANÁLISE DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE - MÉTODO DPPH

A atividade antioxidante medida pelo método DPPH nos resíduos das uvas apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) entre todas os resíduos conforme pode se observar na Tabela 4 e a Figura 9, onde o resíduo Merlot teve o valor mais alto, seguido de Pinot Noir, Cabernet Sauvignon e Shiraz, com valores de 3271,01; 2405,58; 1323,39 e 1032,91 (mg Eq-Trolox/100 g de amostra em base seca) respectivamente. Os valores encontrados em nosso estudo foram menores aos reportados por Samavardhana et al (2015) sobre bagaço de uva variedade *Vitis vinifera* (4090,8 mg TEAC/100 g amostra).

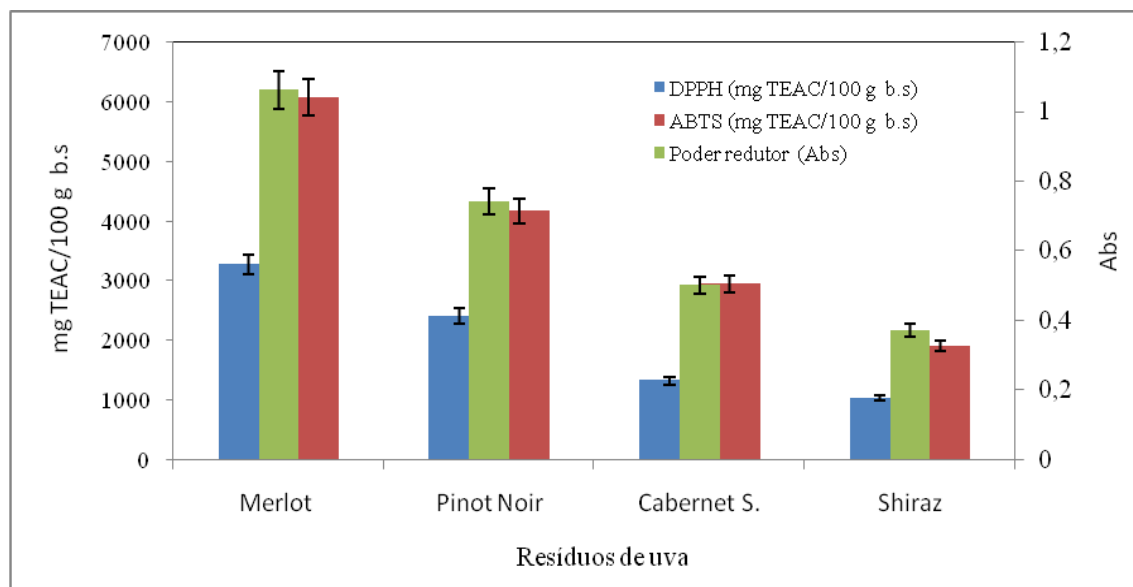
Tabela 4- Capacidade antioxidante pelos métodos de DPPH, ABTS e poder redutor nos resíduos de diferentes variedades de uva procedentes da vinificação.

Resíduos	DPPH mg TEAC/100 g b.s.	ABTS mg TEAC/100 g b.s.	Poder Redutor (abs.)
Merlot	3271,01 ± 1,61 a	6070,71 ± 0,05 a	1,06±0,05 a
Pinot Noir	2405,58 ± 1,77 b	4166,40 ± 0,1 b	0,74±0,06 b
Cabernet Sauvignon	1323,39 ± 1,63 c	2943,83 ± 0,09 c	0,50±0,04 c
Shiraz	1032,91 ± 1,35 d	1904,42 ± 0,08 d	0,37±0,03 d

Resultados são expressos da média ± desvio padrão (n = 3); Médias com letras diferentes na mesma coluna são diferentes no teste de Tukey ($p < 0,05$); TEAC = Capacidade antioxidante equivalente a trolox; b.s. = Base seca

Nossos resultados foram inferiores aos reportados por Boeira et al, (2008) e Rockenbach et al. (2011a) frente ao bagaço de uva variedade Couderc (4787,25 mg TEAC/100 g amostra), Bagaço de uva Pinot Noir (9502,25 mg TEAC/100 g amostra em base seca) e bagaço de extrato seco da variedade Cabernet Sauvignon (5210,75 mg TEAC/100 g amostra em base seca). Comparando com as cascas de uvas variedade Isabel (4745,5 mg TEAC/100 g amostra em base seca) e variedade Niágara (4925 mg TEAC/100 g de amostra em base seca) reportados por Soares et al (2008) seus valores foram ligeiramente superiores a nossos resultados. Por enquanto a capacidade antioxidante de nossos resíduos foram superiores aos reportados por Abe et al (2007) quando foram comparadas com seus resultados de capacidade antioxidante das bagas de uvas Shiraz (257,5 mg TEAC/100 g de amostra úmidas) e Merlot (302,5 mg TEAC/100 g de amostra úmidas) de cultivares de videiras produzidas em Minas Gerais.

Figura 9- Capacidade antioxidante por método de DPPH, ABTS (mg eq-trolox/100 g b.s.) e do poder redutor (Absorbância) nos resíduos de uva procedentes da vinificação.



3.5 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE - MÉTODO ABTS

A atividade antioxidante pelo método ABTS nos resíduos das uvas apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) entre todos os resíduos na ordem de Merlot, Pinot Noir, Cabernet Sauvignon e Shiraz, conforme se pode observar na Tabela 4 e Figura 9, onde o resíduo da uva Merlot foi o que apresentou o valor mais alto igual a 6070,71 (mg Eq-Trolox/100 g) ou (242,83 μ Mol Eq-Trolox/g) em base seca, assim mesmo resultou que o resíduo da uva Shiraz foi a amostra que teve o valor mais baixo com um teor de 1904,04 mg Eq-Trolox/100 g ou 76,16 μ Mol Eq-Trolox/g de amostra em base seca. Entanto o resíduo Merlot foi superior comparado com cascas de uva variedade Niágara liofilizada (4400 mg TEAC/100 g em base seca); assim mesmo o valor de nossos resíduos Merlot e Pinot Noir foram superiores aos reportados por Siqueira et al. (2011); Soares et al. (2008), para casca de uva Isabel (2441,75 mg Eq-Trolox/100 g amostra em peso seco) e cascas de uva Isabel e Niágara com (2230,5 e 3932,75 mg Eq-Trolox/100 g em base seca) respectivamente. O valor do resíduo de uva Cabernet Sauvignon foi inferior ao obtido por Ruberto et al. (2007) sobre a casca de uva da variedade Cabernet Sauvignon (4075 mg trolox/100 g amostra em base seca), sobre este resultado ditos autores consideram que suas amostras têm alto potencial antioxidante, baixo esta mesma consideração nossas amostras resíduos de uva Merlot e Pinot Noir seriam também considerado amostras com alto potencial antioxidante.

Por enquanto comparadas com os reportados por Boeira et al, (2008); Balestro et al. (2009), sobre o bagaço de uva Pinot Noir (8979,75 mg Eq-Trolox/100 g), bagaço de uva Bordô escura de Caxias do Sul, RS, Brasil (8315 mg Eq-Trolox/100 g de amostra em base seca), seus resultados foram superiores aos teores de nosso estudo. Então a variabilidade dos valores tanto para o método DPPH e o método ABTS deve-se provavelmente as características de cada amostra onde sua diferencia esteve marcada pelo tipo de cultivo, variedade, solos e aspectos climáticos. Os dois métodos apresentaram comportamento quantitativo semelhantes quando os antioxidantes das amostras reagem frente ao radical DPPH e ABTS transferindo um elétron ou hidrogênio que ao reduzir perde sua coloração característico do radical, desta forma avalia-se o poder redutor do antioxidante que ao doar um elétron se oxida, tornando-se um composto mais estável. Assim, sua absorbância diminuiu o qual foi notado visualmente pela descoloração da solução de DPPH e do ABTS através da utilização de um espectrofotômetro (HUANG et al., 2005).

3.6 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE – PODER REDUTOR

O poder redutor para medir a capacidade de reduzir radicais livres nos resíduos das uvas apresentou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre todos os resíduos na ordem de Merlot, Pinot Noir, Cabernet Sauvignon e Shiraz. Nessa mesma ordem o resíduo da uva Merlot foi o que apresentou a maior absorbância igual a 1,06 pelo tanto foi amostra que teve o melhor poder redutor, assim mesmo resultou que o resíduo da uva Shiraz foi a amostra que teve o valor mais baixo de absorbância igual a 0,37. Dos valores encontrados o poder redutor das amostras foi uma medida que fornece uma estimativa da capacidade de um composto em reduzir Fe^{+3} (na forma de ferricianeto) para Fe^{+2} (forma ferrosa) na presença de um composto antioxidante através da mudança do cor amarelo da solução para tons verde azul, formando o composto azul da Prússia (Ferreira et al., 2007).

3.7 ANÁLISE DE COR

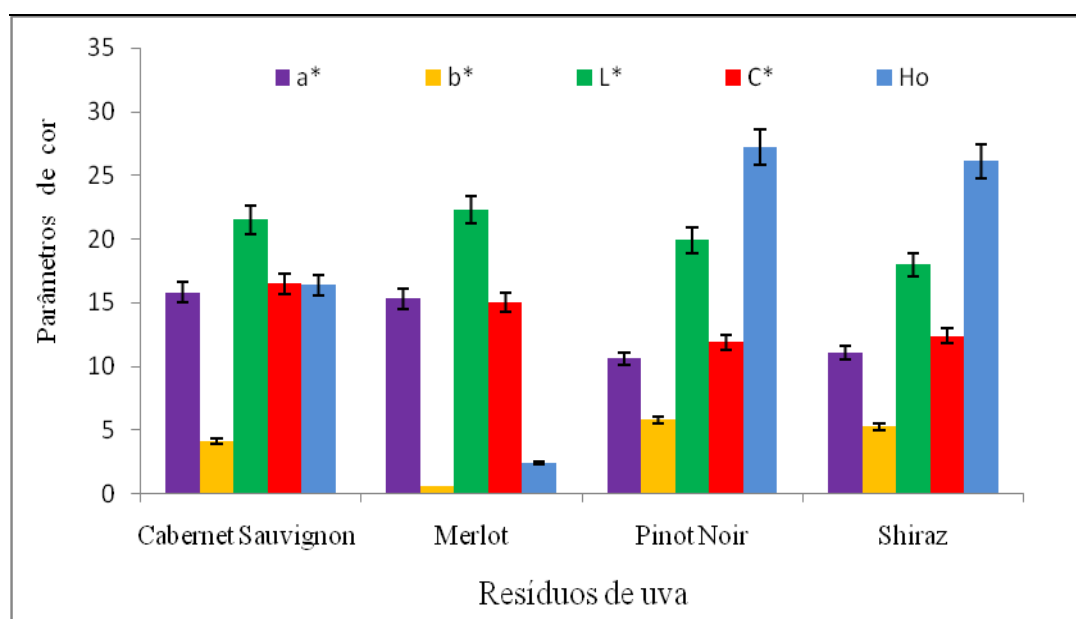
Na Tabela 5 e Figura 10, apresentam-se os valores médios e desvio padrão dos parâmetros de cor CIELab, L^* , a^* , b^* , ângulo *Hue* e Cromaticidade (C°) determinados nos resíduos de diferentes variedades de uva procedentes da vinificação.

Tabela 5 - Parâmetros de cor nos resíduos de diferentes variedades de uva procedentes da vinificação.

Resíduos	Parâmetros de cor				
	a*	b*	L*	C*	H°
Cabernet					
Sauvignon	15,81 ±1,2 a	4,13 ±1,7b	21,50 ±0,2 b	16,51 ±1,0 a	16,47 ±4,5 b
Merlot	15,05 ±0,4 a	0,64 ±0,2c	22,32 ±0,4 a	15,06 ±0,9 a	2,40 ±0,9 c
Pinot Noir	10,61 ±0,2 b	5,80 ±0,1a	19,92 ±0,2 c	11,97 ±0,6 b	27,29 ±3,4 a
Shiraz	11,16 ±0,5 b	5,30 ±0,1a	18,04 ±0,2 d	12,45 ±1,2 b	26,11 ±1,9 a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade; C= Cromaticidade; H°= Tonalidade

Figura 10 - Parâmetros de cor nos resíduos de diferentes variedades de uva procedentes da vinificação.



Observou-se que os valores do parâmetro (a*) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os resíduos de uva Merlot e Cabernet Sauvignon, da mesma maneira foram Pinot Noir e Shiraz, sobre a escala do parâmetro (b*) o resíduo da variedade Merlot teve diferença significativa com as demais amostras o que indicou uma maior tendência da coloração azul. Portanto o valor deste parâmetro foi positivo e indicaram que os resíduos das variedades Cabernet Sauvignon e Merlot foram os que apresentaram-se mais vermelhos. Sobre a luminosidade o resíduo Shiraz é o que apresentou uma cor mais escura que os demais resíduos, mas esse parâmetro não foi uma

expressão própria da intensidade vermelha. Respeito à cromaticidade e tonalidade, o resíduo Shiraz e Pinot Noir foram os que apresentaram diferença significativas com os demais resíduos, os resíduos Merlot e Cabernet Sauvignon tiveram altos valores de cromaticidade, por enquanto estas duas amostras foram mais escuras e vermelhas, pelas características de tonalidade pode-se confirmar ao alto conteúdo de antocianinas totais, entanto o resíduo Merlot de uva foi o que apresentou o teor mais alto de antocianinas. Segundo trabalhos realizados por Cliff, King e Schlosser (2007), a maior concentração de antocianinas pode haver contribuído para que os produtos e subprodutos de uvas apresentassem maiores valores de cromaticidade e tonalidade de cor.

4. CONCLUSÃO

Todos os resíduos de uva procedentes da vinificação avaliadas apresentaram valores de pH idênticas as bagas de uva, de acidez total titulável mais alta e de sólidos solúveis mais baixo das bagas de uva, devido à concentração de hidrogênios nesse médio, facilitando sua estabilidade físico química como substrato ideal para sua conservação e ser utilizado no processo industrial.

Da composição química centesimal de todos resíduos da vinificação o resíduo da variedade Merlot foi o que apresentou o conteúdo mais baixo de valor energético, pelo tanto à influência de sua composição foi produto da variedade de uva e da tecnologia de produção de resíduos.

Dos resíduos de uvas avaliadas determinou-se que existiu uma influência da presença das antocianinas sobre o conteúdo dos fenólicos totais, onde o resíduo de uva da variedade Merlot apresentou os valores mais altos em antocianinas, flavonóides totais e fenólicos totais.

Dos resíduos de uvas avaliadas determinou-se que as antocianinas, flavonóides totais e fenólicos totais, tiveram uma relação direta sobre métodos de sequestro de radicais livres ABTS e DPPH, onde o resíduo de uva da variedade Merlot apresentou os valores mais altos de atividade antioxidante e do poder redutor como um indicativo de sua alta atividade antioxidante.

Os resíduos de maior coloração vermelha apresentaram maior conteúdo de antocianinas, compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante.

Os resíduos de uva da variedade Merlot avaliados constituem uma boa fonte de antocianinas totais, compostos fenólicos totais e de alta capacidade antioxidante, e resultando com valores mais elevados que muitas frutas brasileiras, podendo se utilizar como um alimento funcional.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

AMICO, V.; CHILLEMI, R.; MANGIAFICO, S.; SPATAFORA, C.; TRINGALI, C.; Polyphenol-enriched fractions from Sicilian grape pomace: HPLC-DAD analysis and antioxidant activity. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 5960-5966, 2008.

ANASTASIADI, M.; PRATSINIS, H.; KLETSAS, D.; SKALTSOUNIS, A.; HAROUTOUNIAN, S. Bioactive non-coloured polyphenols content of grapes, wines and vinification by-products: Evaluation of the antioxidant activities of their extracts. **Food Research International**, v. 43, p. 805-813, 2010.

AOAC - Association of official analytical chemists. **Official Methods of Analysis**. 16 ed. Washington DC, EUA, 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, p. 191-203, 2006.

BALESTRO, E.; SANDRI, G.; FONTANA, R. Utilização de bagaço de uva com atividade antioxidante na formulação de barra de cereais. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 13, n. 2, p. 203-209, 2011.

BAUMGARTEL, T.; KLUTH, H.; EPPERLEIN, K.; RODEHUTSCORD, M. Note on digestibility and energy value for sheep of different grape pomace. **Small Ruminant Research**, v. 67, p. 302-306, 2007.

BOEIRA, B.; CALIARI, V.; GONZAGA, L.; KUSKOSKI, E.; FETT, R. Atividade antioxidante e conteúdo fenólico do resíduo agroindustrial da produção de vinho Antioxidant activity and phenolic content of agricultural by-products from wine production. **Ciências Agrárias**, v. 29, n. 1, p. 93-102, 2008.

BORDIGNON-LUIZ, M. T.; GAUCHE, C.; GRIS, E. F.; FALCÃO, L. D. Colour stability of anthocyanins from Isabel grapes (*Vitis labrusca* L.) in model systems. **LWT – Food Science and Technology**, v. 40, n. 4, p. 594–599, 2007.

BRENES, A.; VIVEROS, A.; CHAMORRO, S.; ARIJA I. Use of polyphenol-rich grape by-products in monogastric nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, v. 211, p. 1–17, 2016.

BUCIC-KOJIC, A.; PLANINIC, M.; TOMAS, S.; BILIC, M.; VELIC, D. Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grapes seeds. **Journal of Food Engineering**, v. 81, n. 1, p. 236-242, 2007.

CAMPOS, L. M. A. S.; LEIMANN, F. V.; PEDROSA, R. C.; FERREIRA, S. R. S. Free radical scavenging of grape pomace extracts from Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L.). **Bioresource Technology**, v. 99, p. 8413-8420, 2008.

CHAVES, M. C.; GOUVEIA, J. P.; ALMEIDA, F. A.; LEITE, J. C.; SILVA, F. L. Caracterização físico-química do suco da acerola. **Revista de Biologia e Ciências da terra**, v. 4, n. 2, 2004.

CLIFF, M. A.; KING, M. C.; SCHLOSSER, J. Anthocyanin, phenolic composition, colour measurement and sensory analysis of BC commercial red wines. **Food Research International**, v. 40, p. 92-100, 2007.

DA MOTA, R.; DE SOUZA, C.; FAVERO, A.; CARVALHO, C.; LOPES DO CARMO, E.; FONSECA, A.; ALBUQUERQUE, M. Produtividade e composição físico-química de bagas de cultivares de uva em distintos porta-enxertos. **Pesq. agropec. bras.**, v. 44, n. 6, p. 576-582, 2009.

DA MOTA, R.; CARVALHO, C.; FAVERO, A.; PURGATTO, E.; MISUZU, T.; ALBUQUERQUE, M. Composição físico-química de uvas para vinho fino em ciclos de verão e inverno. **Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP**, v. 32, n. 4, p. 1127-1137, 2010.

DA SILVA B.; SATO, S.; RUFFO, S. Caracterização fenológica e produtiva das videiras ‘Cabernet Sauvignon’ e ‘Alicante’ (*Vitis vinifera* L.) produzidas fora de época, no norte do Paraná. **Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP**, v. 32, n. 2, p. 451-462, 2010.

DENG, Q.; PENNER, M.; ZHAO, Y. Chemical composition of dietary fiber and polyphenols of five different varieties of wine grape pomace skins. **Food Research International**, v. 44, n. 9, 2712-2720, 2011.

FELDBERG, N.; VIEIRA, R.; LIMA, W.; ALBUQUERQUE, M. Viabilidade da utilização de descartes de produção de uvas sem sementes para elaboração de passas. **Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal-SP**, v. 30, n. 3, p. 846-849, 2008.

FERREIRA, I.; BAPTISTA, P.; VILAS-BOAS, M.; BARROS, L. Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1511-1516, 2007.

FLAMINI, R. Mass spectrometry in grape and wine chemistry. Part I: Polyphenols. **Mass Spectrometry**, v. 22, p. 218-250, 2003.

GABETTA, B.; FUZZATTI, N.; GRIFFINI, A.; LOLLA, E.; PACE, R.; RUFILLINI, T. Characterization of proanthocyanidins from grape seeds. **Fitoterapia**, v. 71, p. 172-175, 2000.

GIUSTI, M.M.; WROLSTAD, R.E. Anthocyanins. Characterization and Measurement with UV-Visible Spectroscopy. In: Wrolstad, R. E. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, v. 2, p. 1-13, 2001.

GOMEZ-PLAZA, E.; MINANO, A.; LOPÉZ-ROCA, J. M. Comparison of chromatic properties, stability and antioxidant capacity of anthocyanin-based aqueous extracts from grape pomace obtained from different vinification methods. **Food Chemistry**, v. 97, n. 1, p. 87-94, 2006.

GONZÁLEZ-PARAMÁS, A.; ESTEBAN-RUANO, S.; SANTOS-BUELGA, C.; PASCUAL-TERESA, S.; RIVAS-GONZALO, J. Flavanol content and antioxidant activity in winery by products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 234-238, 2004.

HAYASAKA, Y.; WATERS, E. J.; CHEYNIER, V.; HERDERICH, M. J.; VIDAL, S. Characterization of proanthocyanidins in grape seeds using electrospray mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 17, p. 9-10, 2003.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; TRONCOSO, A. M.; GARCIA M.; FETT, R. Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 691-693, 2004.

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

LAGO-VANZELA, E.; DA SILVA, R.; GOMES, E.; GARCIA-ROMERO, E.; HERMOSIN-GUTIERREZ, I. Phenolic composition of the edible parts (flesh and skin) of Bordô grape (*Vitis labrusca*) using HPLC-DAD-ESI-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 13136-13146, 2011.

LLOBERA, A.; CAÑELLAS, J. Dietary fiber content and antioxidant activity of Manto Negro red grape (*Vitis vinifera* L.): Pomace and stem. **Food Chemistry**, v. 101, p. 659-666, 2007.

MALACRIDA, C. R.; MOTTA, S. Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva. **Revista Ciência e Tecnologia em Alimentos, Campinas**, v. 25, n. 4, p. 659-664, 2005.

MURGA, R.; RUIZ, R.; BELTRÁN, S.; CABEZAS, J. L. Extraction of natural complex phenols and tannins from grape seeds by using supercritical mixtures of carbon dioxide and alcohol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 8, p. 3408-3412, 2000.

NEGRO, C.; TOMMASI, L.; MICELI, A. Phenolic compound as and antioxidant activity from red grape marc extracts. **Bioresource Technology**, v. 87, p. 41-44, 2003.

NENADIS, N.; WANG, L. F.; TSIMIDOU, M.; ZHANG, H. Y. Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS^{•+} assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 4669-4674, 2004.

PASSOS, C. P.; CARDOSO, S. M.; ROSARIO, M.; DOMINGUES, M; Evidence for galloylated type- A procyanidins in grape seeds. **Food Chemistry**, v. 105, P. 1457-1467, 2007.

REBELLO, L.; LAGO-VANZELA, E.; BARCIA, M. T.; RAMOS, A.; STRINGHETA, P.; DA-SILVA, R.; CASTILLO-MUÑOZ, N.; GÓMEZ-ALONSO, S.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ I. Phenolic composition of the berry parts of hybrid grape cultivar BRS Violeta (BRS Rubra×IAC 1398-21) using HPLC–DAD–ESI-MS/MS. **Food Research International**, v. 54, p. 354–366, 2013.

ROCKENBACH, I.; GONZAGA, L.; RIZELIO, V.; GONÇALVES, A.; GENOVESE, M.; FETT, R. Phenolic compounds and antioxidant activity of seed and skin extracts of red grape (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) pomace from Brazilian winemaking. **Food Research International**, v. 44, p. 897–901, 2011a.

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

RUBERTO, G.; RENDA, A.; DAQUINO, C.; AMICO, V.; SPATAFORA, C.; TRINGALI, C.; DE TOMMASI, N. Polyphenol constituents and antioxidant activity of grape pomace extracts from five Sicilian red grape cultivars. **Food Chemistry**, v. 100, p. 203-210, 2007.

SAMAVARDHANA, K., SUPAWITITPATTANA, P., JITTREPOTCH, N., ROJSUNTORNKITT, K. AND KONGBANGKERD, T. Effects of extracting conditions on phenolic compounds and antioxidant activity from different grape processing byproducts. **International Food Research Journal**, v. 22, n. 3, p. 1169-1179, 2015.

SANCHEZ-ALONZO, I.; SOLA, M.; BORDERIAS, A. Physical study of minced fish muscle with a white-grape by-product added as an ingredient. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 2, p. 94-1001, 2007.

SANCHEZ-ALONZO, I.; JIMENEZ-ESCRIG, A.; SAURA-CALIXTO, F; BORDERIAS, A. Antioxidant protection of white-grape pomace on restructures fish products during frozen storage. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v. 41, p. 42-50, 2008

SÁYAGO-AYERDI, S. G.; BRENES, A.; GOÑI, I. Antioxidative effect of dietary grape pomace concentrate on lipid oxidation of chilled and long- term frozen stored chicken patties. **Meat Science**, v. 83, p. 528-533, 2009.

SIQUEIRA, P.; BOONE, K.; TIVERONI, A.; PRADO, A. CADORIN, T.; ZANUS, M.; PEREIRA, G.; MATIAS, S. Composição fenólica e atividade antioxidante de resíduos agroindustriais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 6, p. 1088-1093, 2011

SOARES, M.; WELTER, L.; KUSKOSKI, E.; GONZAGA, L.; FETT, R. Compostos fenólicos e atividade antioxidante da casca de uvas Niágara e Isabel. **Rev. Brasileira de Fruticultura Jaboticabal - SP**, v. 30, n. 1, p. 059-064, 2008.

TEIXEIRA, M. **Estudo dos compostos fenólicos e capacidade antioxidante de subprodutos do processo de vinificação**. 2014. 234f. Tese (Doutorado em de Ciência de alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, 2014.

YANG, J.; MARTINSON, T.; LIU, R. Phytochemical profiles and antioxidant activities of wine grapes. **Food Chemistry**, v. 116, p. 332-339, 2009.

YOU-TUNG, L.; CHENG-CHENG, P.; SHWU-TZY, W.; CHI-YUE, C. Effect of Different Germination Conditions on Antioxidative Properties and Bioactive Compounds of Germinated Brown Rice. **Journal Bio Med Research International**, v. 2015, p. 1-10, 2015.

WANG, W.; XU, S. Degradation kinetics of anthocyanins in blackberry juice and concentrate. **Journal of Food Engineering**, v. 82, p. 271-275, 2007.

VOLP, A. C. P.; RENHE, I. R. T.; BARRA, K.; STRINGUETA, P. C. Flavonóides antocianinas: características e propriedades na nutrição e saúde. **Revista Brasileira Nutrição Clínica**. v. 23, n. 2, p. 141-149, 2008.

ZIELINSKI, H.; KOZLOWSKA, H. Antioxidant activity and total phenolics in selected cereal grains and their different morphological fractions. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 48, p. 2008-2016, 2000.

ARTIGO II

**ESTUDO DA EXTRAÇÃO DE FENÓLICOS E *TRANS*-RESVERATROL, E
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DOS RESÍDUOS
DA VINIFICAÇÃO.**

RESUMO

Os extratos foram obtidos por extração sólido-líquida dos resíduos de uva (*Vitis vinifera* L.), das variedades: Merlot, Shiraz, Pinot Noir e Cabernet Sauvignon, procedentes da vinificação utilizando como solventes etanol, metanol, acetona e suas misturas e a enzima celulase. Nos extratos determinou-se *trans*-resveratrol por cromatografia líquida de alta eficácia. O extrato metanólico apresentou alto conteúdo de compostos fenólicos e alta atividade antioxidante. O extrato de Cabernet Sauvignon apresentou maior conteúdo de antocianinas e o extrato Merlot apresentou maior conteúdo de fenólicos totais (1601,1 mg mv-3-glc./100 g e 9366,4 mg ácido galico/100 g de extrato em matéria seca, respectivamente). O maior conteúdo de flavonóides totais foi do extrato Shiraz (192,2 mg quercetina/100 g de extrato), determinou-se maior atividade antioxidante no extrato Merlot frente aos métodos de captura de radicais livres 1,1-difenil-2-picrilhidrazil e 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido-sulfônico) (5057,3 e 4986,2 mg equivalente de trolox/100 g de extrato, respectivamente), e com o método de poder redutor o extrato Shiraz apresentou a maior atividade antioxidante. O extrato do resíduo da variedade Shiraz apresentou o conteúdo mais alto de *trans*-resveratrol (3,7 mg resveratrol/100 g de extrato em matéria seca).

Palavras-chave: Resíduos da vinificação. *Trans*-resveratrol. Atividade antioxidante. Fenólicos. Flavonóides.

1 INTRODUÇÃO

Os resíduos de uva provenientes da vinificação geralmente estão constituídos por cascas e semente, elementos importantes donde se acumula a maior parte de compostos fenólicos, classificados entre os flavonóides e não flavonóides que tem alta atividade antioxidante. Desta maneira tornam-se uma fonte natural de fitoquímicos e antioxidantes que precisam de uma boa extração e purificação. Por isso é importante o estudo da extração e caracterização de compostos fenólicos com propriedades benéficas para a saúde, atribuídas a sua ação antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatória e vasodilatadora, utilizados muito em farmacologia, cosmetologia e a saúde. (ARVANITOYANNIS; LADAS; MAVROMATIS, 2006; FONTANA; ANTONIOLLI; BOTTINI, 2013; TSENG; ZHAO, 2013; XU et al., 2010).

Os compostos fenólicos presentes no resíduos da uva pertencem a uma classe de estruturas simples e complexas, das quais possui pelo menos um anel aromático no qual ao menos um hidrogênio é substituído por um grupo hidroxila, resultando assim o fenol como o composto mais simples, podendo ser classificados em dois grupos: não-flavonóides e flavonóides. Os compostos não-flavonóides compreendem os ácidos fenólicos, benzóicos e cinâmicos, e outros derivados fenólicos como o *trans* e *cis* resveratrol. Sua atividade antioxidante está relacionada com a posição dos grupos hidroxila e quanto mais próximo esse grupo estiver do grupo fenil, maior será a capacidade antioxidante do grupo hidroxila na posição meta. O resveratrol é uma fitoalexina quimicamente conhecida como 3,5,4'-trihidroxistilbeno que está presente nas cascas de uvas, sementes, nos bagaços da vinificação e nos vinhos, o conteúdo de resveratrol depende principalmente das variedades de uva, clima o solo (FERRI et al., 2009; GATTO et al., 2008; VITRAC et al., 2005; SILVA et al., 2011).

O resveratrol atua como sistema de defesa nas células da casca da uva, por isso o conteúdo de *trans*-resveratrol nos vinhos tintos é muito mais elevado do que nos brancos (ROMERO-PEREZ et al., 2001; GAMBUTI et al 2004; ATANACKOVIĆ et al., 2012). O *trans*-resveratrol tem efeitos benéficos sobre a saúde cardiovascular humana, devido a sua capacidade de inibir a agregação plaquetária e de produzir vaso-relaxação dependente de óxido nítrico endotelial *in vivo*, elimina o cancer já que o *trans*-resveratrol inibe a proliferação de células tumorais (XIANG et al., 2014; MACEDO et al., 2013).

Os flavonóides são compostos polifenólicos que tem uma estrutura de base de 15 átomos de carbono que compreendem dois anéis aromáticos ligados através de uma cadeia 3 de carbono (C₆-C₃-C₆), que podem ou não ser parte de um terceiro anel. Destes compostos podem-se citar as flavonas, flavononas, isoflavonas, flavanóis e antocianinas. Os flavonóides

são os principais componentes químicos terapêuticos sendo potentes antioxidantes, seqüestrantes de radicais livres, quelantes de metais e inibidores da peroxidação. As catequinas presentes na planta são poderosos antioxidantes inibindo os danos causados ao DNA pelas espécies reativas de oxigênio, a imunossupressão e a inflamação cutânea induzida pelos raios UV. Sua atividade antioxidante deve-se ao mecanismo de transferência de elétrons destas para as espécies reativas de oxigênio, atuando como seqüestrantes dos radicais livres e dentre as catequinas presentes nas plantas, a epigallocatequina galato é o composto mais efetivo como antioxidante na proteção de DNA (IACOPINI et al, 2008; MITIĆ et al., 2012; GARRIDO; BORGES, 2013; MOON; SHIBAMOTO, 2009).

Existem estudos sobre a extração de compostos fenólicos com solventes dos resíduos sólidos da indústria de vinho, onde os resultados mostraram que os extratos destes bagaços têm quantidades elevadas de fenólicos totais, flavonóides totais e boa atividade antioxidante. Após conhecer que estes compostos antioxidantes estão presentes nos bagaços de uva e que tem grandes efeitos benéficos para a saúde, o estudo da extração e purificação dos compostos biotivos de estes resíduos torna-se muito importante para conhecer a identificação qualitativa e quantitativa de seus fitoquímicos e assim ter uma nova fonte de antioxidantes naturais, uma das metodologias comumente utilizada e a extração sólido-líquido mediante uso de solventes como o metanol, etanol e acetona, aplicados pequena variação de pH e temperatura (MANTELL; RODRIGUEZ; MARTINEZ DA OSSA, 2002; PINELO et al., 2005; CISSÉ et al., 2012; CACACE; MAZZA, 2003).

A extração sólido-líquido é um dos métodos mais utilizados para a separação de fenólicos, esta ocorre devido a que se produz uma remoção dos compostos antioxidantes do bagaço de uva frente a um solvente líquido com alta polaridade, esse contato de solvente-soluto permite a separação dos solutos, que depende da polaridade das moléculas dos compostos antioxidantes e da solubilidade dos solventes o qual depois de algum tratamento levam na parte sobrenadante a recuperação dos fenólicos e que a partir deste podem ser tratadas com técnicas de separação ou purificação de moléculas específicas ou da mistura de compostos fenólicos (SPIGNO; DE FAVERI, 2007; RODRIGUEZ-SAONA; WROLSTAD, 2001; PINELO; FABBRO; MANZOCCO, 2005; LAPORNIK; PROSEK; WONDRA, 2005; LIU et al., 2013; GORINSTEIN et al., 2004).

Portanto, o objetivo do presente trabalho foi determinar a extração de compostos fenólicos e *trans*-resveratrol, caracterização fenólica e a avaliação da atividade antioxidante de diferentes extratos de resíduos da vinificação (*Vitis vinifera* L.).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 REAGENTES

Todos os reagentes utilizados foram de qualidade P.A. e também água destilada deionizada foi utilizada em todo o processo. A enzima celulase foi do tipo blend (código: SAE0020) adquirida do Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha).

2.2 AMOSTRAS

A matéria prima utilizada neste trabalho foram os resíduos da vinificação de uvas pretas da espécie *Vitis vinifera* L., em suas variedades: Merlot, Shiraz, Pinot Noir e Cabernet Sauvignon, coletadas em Flores Acunha Caixas do Sul no RS-Brasil. As amostras foram armazenadas a -18 °C até sua utilização nos experimentos. As amostras tiveram conformado por quantidades de massa em casca e semente, nas seguintes proporções: Shiraz (45% de semente e 55% de casca), Pinot noir (30% de semente e 70% de casca), Merlot (18,2% de semente e 82,8% de casca) Cabernet sauvignon (5% de semente e 95% de casca),

2.3 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

A extração sólido-líquida dos compostos fenólicos e da molécula de *trans*-resveratrol utilizando diferentes solventes, sobre os resíduos da vinificação foi feita conforme o esquema apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 - Esquema experimental para a extração de compostos fenólicos e resveratrol.

Resíduos	Métodos de extração						
	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	T ₇
Merlot (R ₁)	R ₁	R ₁	R ₁	R ₁	R ₁	R ₁	R ₁
Shiraz (R ₂)	R ₂	R ₂	R ₂	R ₂	R ₂	R ₂	R ₂
Cabernet Sauvignon (R ₃)	R ₃	R ₃	R ₃	R ₃	R ₃	R ₃	R ₃
Pinot Noir (R ₄)	R ₄	R ₄	R ₄	R ₄	R ₄	R ₄	R ₄

T1: Extração etanólico (70%) acidificado, T2: Extração com acetona (70%) acidificada, T3: Extração etanol-acetona (70%) acidificada, mistura tipo I, T4: Extração etanol-acetona (70%) acidificada, mistura tipo II, T5: Extração metanólica, T6: Extração enzimática, T7: Extração etanólica-enzimática.

2.3.1. Extração etanólica (70%) acidificada (T₁)

A extração foi feita em triplicata, com o emprego de solvente etanol:agua (70:30 v/v). Pesaram-se 5 g de cada resíduo moído e homogeneizado, adicionou-se 15 mL do solvente. Em seguida foi acidificado com HCL 0,1 M até pH 1,5 a temperatura ambiente e deixou-se em repouso por 24 h. Logo foi centrifugado a 5000 xg em centrífuga Modelo Biosystem-LPW350 por 15 min e separou-se o sobrenadante, que foi lacrado com folha de alumínio e guardado em refrigeração para as análises (ROCKENBACH et al., 2011b).

2.3.2 Extração com acetona (70%) acidificada (T₂)

O extrato foi preparado com o emprego de solvente acetona:agua (70:30 v/v), pesaram-se 5 g de cada resíduo moído e homogeneizado, adicionou-se 15 mL do solvente. Acidificado com HCL 0,1 M até pH 1,5 a temperatura ambiente e deixou-se em repouso durante 24 h. Logo foi centrifugado a 5000 xg durante 15 min e separou-se o sobrenadante, que foi lacrado com folha de alumínio e guardado em refrigeração para as análises (BAYDAR et al., 2004).

2.3.3 Extração etanol-acetona acidificada, mistura tipo I (T₃)

Os solventes foram etanol (70%) e acetona (70%), a mistura dos solventes foi preparada na proporção 50:50 v/v, foi pesado 5 g de cada resíduo moído e homogeneizado, adicionou-se 15 mL da mistura dos solventes. Em seguida foi acidificado com HCL 0,1 M até pH 1,5 a temperatura ambiente, deixou-se em repouso durante 24 h. Logo foi centrifugado a 5000 xg durante 15 min e separou-se o sobrenadante, que foi colocado em recipiente escuro, lacrado com folha de alumínio e guardado em refrigeração para as análises (Método adaptado pelo próprio autor)

2.3.4 Extração etanol-acetona (70%) acidificada, mistura tipo II (T₄)

Foi pesado 5 g de cada resíduo moído e homogeneizado, primeiramente adicionou-se 10 mL do solvente etanol 70% acidificado com HCL 0,1 M até pH 1,5 e deixado em repouso a temperatura ambiente durante 24 h. Logo foi centrifugado a 5000 xg durante 15 min e separou-se o sobrenadante. O resíduo restante foi tratado com 10 mL de

acetona ao 70% acidificada com HCL 0.1 M até pH 1,5, também deixado em repouso a temperatura ambiente durante 24 h, centrifugado e separado o sobrenadante. Depois foram misturados os dos sobrenadantes, colocados num recipiente escuro, lacrados com folha de alumínio e guardado em refrigeração para as análises (Método adaptado pelo próprio autor).

2.3.5 Extração metanólica (T₅)

Empregou-se como solvente metanol 98% acidificado com HCL 0,1 M até pH 1,5. Adicionou-se 15 mL deste solvente em 5 g de cada resíduo deixando-se, em repouso durante 24 horas a temperatura ambiente. Depois foi centrifugado a 5000 xg durante 15 min e separou-se em recipiente escuro e foi lacrado com folha de alumínio e guardado em refrigeração para as análises (CASAZZA et al., 2010).

2.3.6 Extração enzimática (T₆)

Foi feita uma suspensão de 50% de resíduos em água destilada, ajustados a um pH 5,3 com ácido cítrico 10%, foi adicionado 25 µL de enzima celulase (atividade de tipo endoglucanases que clivam ligações internas da fibra celulósica) em 50 g de suspensão, com agitação a 37 °C durante 2 h. Logo foi centrifugado a 5000 xg durante 15 min e separou-se o sobrenadante em recipiente escuro, lacrado com folha de alumínio e guardado em refrigeração para as análises (SINEIRO et al., 2008).

2.3.7 Extração etanólica-enzimática (T₇)

Primeiro realizou-se a extração enzimática (T₆) para quebrar a estrutura celulósica dos resíduos e depois do centrifugado a 5000 xg durante 15 min, separou-se o sobrenadante (A). Logo os resíduos precipitados foram tratados em uma suspensão de 50% em etanol 98% acidificado até pH 1,5, centrifugado e separado o sobrenadante (B). Finalmente misturou-se os sobrenadantes (A e B) e deixou-se em recipiente escuro, lacrado com folha de alumínio e guardado em refrigeração para as análises (Método adaptado pelo próprio autor).

2.4 DETERMINAÇÃO DE ANTOCIANINAS TOTAIS

O conteúdo de antocianinas foi determinado nos extratos da vinificação das uvas pelo método da diferença de pH, em que se dissolve em dois sistemas-tampão: cloreto de potássio pH 1,0 (0,025 M) e acetato de sódio pH 4,5 (0,4 M), a leitura da absorbância foi realizada a 510 nm, considerando a absorbância máxima para cianidina-3-glicosídeo, e 700 nm para descontar a turbidez da amostra (GIUSTI; WROSLTAD, 2001)

O teor de Antocianinas foi calculado a partir da seguinte Equação:

$$\text{Teor de Antocianinas } \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}}\right) = A \times MM \times FD \times 10^3 / (\epsilon \times l) \quad (1)$$

$$A = [(A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}1,0} - (A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}4,5}] \quad (2)$$

Onde: A_{510} = Absorbância das amostras lidas a 510 nm

A_{700} = Absorbância das amostras lidas a 700 nm

MM = Massa molecular da cianidina 3-glicosídeo 449,2 (g/mol)

FD = Fator de diluição, l = Espessura da cubeta (cm)

ϵ = Absortividade molar (26900), que corresponde à cianidina 3-glicosídeo.

2.5 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

Foi realizado conforme o método de Folin-Ciocalteu, que consistiu em utilizar 5 mL de extrato, após realizou-se uma centrifugação de 5000 xg por 15 minutos. Em seguida separou-se do sobrenadante 0,5 mL desse extrato em um tubo de ensaio, ao qual foi adicionado 8 mL de água destilada e 0,5 mL de solução de Folin-Ciocalteu (0,25 M) deixou-se em repouso por 3 minutos, logo adicionou-se 1 mL de solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) 1 M, deixando repousar por 10 minutos. O tubo foi centrifugado (9000 xg por 30 minutos) e mantido na escuridade por duas horas, realizando-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 750 nm sobre cubetas de vidro, tendo como branco o metanol e todos os reagentes sem a alíquota da amostra centrifugada. O teor de fenóis totais (FT) foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico e expressos como mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por 100 g de resíduo seco. Todas as análises foram realizadas em triplicata (BUCIC-KOJIC et al., 2007). A construção da curva de calibração foi preparada com 0, 2, 4, 8, 15, e

20 µL de solução estoque. A equação da linearidade dos fenólicos totais foi $Y = 4,8144X + 0,00003$, onde X corresponde à concentração de fenólicos totais, Y é a absorbância medida a 750nm e $R = 0,998$.

2.6 DETERMINAÇÃO DE FLAVONÓIDES TOTAIS

Foi determinada por ensaio colorimétrico usando cloreto de alumínio como agente cromofórico, de acordo com a metodologia descrita por Yang, Martinson e Liu (2009). Aliquotas de 250 µL de cada amostra foram misturadas com 1,25 mL de água deionizada. Em seguida acrescentou-se 75 µL de solução aquosa de nitrito de sódio (NaNO_2) a 5% e agitados em vórtex. Após 5 min, 150 µL de solução aquosa de cloreto de alumínio (AlCl_3) a 10% foram adicionados e as soluções homogeneizadas. Após 6 min, 0,5 mL de solução aquosa de NaOH a 1,0 M foram adicionados e o volume completado para 3,0 mL com água deionizada. As soluções foram agitadas e as absorbâncias foram medidas a 510 nm, tendo como “branco” o metanol e todos os reagentes, menos os extratos. Para a construção da curva de calibração foi preparada solução estoque e diluições de 0, 20, 40, 80, 100, e 175 µL. A equação obtida foi $Y = 9,3799X + 0,0062$, onde X corresponde à concentração de flavonóides totais, Y é a absorbância e $R = 0,9998$. Os resultados foram expressos como mg de EQ (equivalente de quercetina) por 100 g de extrato seco.

2.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE – MÉTODO DPPH

Foi realizada conforme o método do radical DPPH descrito por Nenadis et al. (2004). Que consistiu em pesar, 5 g de extrato, após realizou-se uma centrifugação de 5000 xg durante 25 minutos. Em seguida separou-se o sobrenadante tomando-se 150 µL desse extrato em tubo de ensaio, ao qual foi adicionado 2,85 mL de solução diluída de DPPH e manteve-se em agitação por 15 minutos na ausência da luz. A absorbância foi medida em espectrofotômetro (Kasuki modelo 10UV), em comprimento de onda de 515 nm, utilizando-se cubetas de vidro. A atividade antioxidante foi determinada com a interpolação da absorbância das amostras contra uma curva padrão construída com Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) e os resultados foram expressos em atividade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC) (mg TEAC por 100 g de resíduo seco). Todas as análises foram realizadas em triplicata. Para a construção da curva de calibração foi preparado 2000 µM/mL de solução estoque de Trolox e diluições de 80, 160, 240, 320, 405,

e 625 μM . A equação da linearidade foi $Y = 0,0012X + 0,0001$, onde X corresponde à concentração de μM (micro molar) de Trolox, Y é a absorbância medida a 515 nm e o coeficiente de correlação foi de $R = 0,999$.

2.8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE – MÉTODO ABTS

Utilizou-se o método de Surveswaran et al. (2007), o radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$ é formado por uma reação química com 5 mL de solução de persulfato de potássio e 88 μL de uma solução de estoque de ABTS (192 mg de reagente ABTS em 50 mL de água destilada). Uma vez formado o radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$, o mesmo foi diluído em etanol até obter-se uma medida de absorbância de 0,70 ($\pm 0,02$) a um comprimento de onda de 734 nm, a temperatura de 30 °C. A absorbância foi medida em espectrofotômetro modelo (Kasuki 10UV), nos tempos 1, 4 e 7 minutos após a adição do extrato. O teor foi determinado por interpolação na curva padrão construída com Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) antioxidante sintético similar à vitamina E e os resultados foram expressos em atividade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC) (mg TEAC por 100 g de extrato seco). Para a construção da curva de calibração foi preparada uma solução estoque de 2 mM/mL e foram feitas diluições de 0, 100, 500, 1000, 1500, e 2000 μM . A Equação de linearidade foi $Y = 0,0003X + 0,0053$, onde X corresponde à concentração de μM (micro molar) de Trolox, Y é a absorbância medida a 734 nm e $R = 0,997$.

2.9 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE - MÉTODO DO PODER REDUTOR

O poder redutor dos extratos de reduzir o íon Fe^{3+} para Fe^{2+} foi determinado pelo método de You-Tung et al. (2015). Um volume de 2 mL de amostra (5 mg/mL) foi adicionado em 2 mL de tampão fosfato 0,2 M (pH 6,6) e 2 mL de ferricianeto de potássio (1%). A seguir, a mistura foi incubada a 50 °C durante 20 minutos, e após adicionou-se na reação 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10%. Uma alíquota de 2 mL foi misturada com 2 mL de água destilada e 0,4 mL de cloreto férrico 0,1% em tubos de ensaio. Após 10 minutos de reação a absorbância da solução resultante foi lida a 700 nm em espectrofotômetro UV/VIS (Kasuki modelo 10UV). O aumento da absorbância da reação indicou aumento de poder de redutor. Todas as amostras foram preparadas em triplicata e em ambiente escuro.

2.10 ANÁLISES DO *TRANS*-RESVERATROL POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUÇÃO

Para a análise do *trans*-resveratrol, 5 mL do extrato de Shiraz, Pinot Noir, Cabernet Sauvignon e Merlot, foram centrifugados a 9000 xg por 30 min, filtradas em Millipore de 0,22 µm, com auxílio de uma seringa, além disso utilizou-se a ultrafiltração com membranas de 10 kD (Advantec MFS, modelo UHP76) para eliminar interferentes dos extratos. O procedimento foi seguido por Cromatografia líquida de alta performance conforme a metodologia descrito por Romero-Perez et al. (2001). O cromatógrafo utilizado teve uma configuração modular composto por uma bomba de tipo LC-10ATvp, detector de arranjo de fotodiodos (SOD-M10A VP) e injetor automático, todos da marca Shimadzu. As filtrações da fase móvel foram realizadas com membranas filtrantes de 0,45 µm de diâmetro de poro (Millipore) em um sistema de filtração ao vácuo e foi feito a degaseificação utilizando Ultrassom por 30 minutos para a retirada as bolhas de ar dissolvidas nos eluentes.

a) Fases Móveis (Eluentes)

Eluente A: Água Milli-Q e Eluente B: Metanol

b) Descrição do Método Condições operacionais utilizadas no HPLC:

Coluna C₁₈, fase reversa (modelo CLC-ODS-M), Shim-pack 250mm x 4,6mm x 5µm mantida a 30 °C; Detetor: 308 nm; Fluxo 0,5 mL/min; Volume injetado: 20 µL; Gradiente de eluição: Concentração de solvente A e B, (50:50); tempo de corrida 10 min.

c) Quantificação do *trans*-resveratrol

Para esta quantificação utilizou-se o área do pico no comprimento de onda definido para o resveratrol (308 nm), onde definiram-se as respectivas retas de calibração.

d) Curva de calibração do resveratrol

Para a construção da curva de calibração, usou-se uma solução padrão estoque de *trans*-resveratrol com uma concentração de 3,88 mg/L, foi preparada em metanol grau HPLC e as soluções de diversas concentrações foram preparadas pela diluição da solução estoque em metanol. A linearidade do *trans*-resveratrol foi construída com injeção, em triplicata, de sete concentrações crescentes de soluções padrão (0,08; 0,39; 0,97; 1,56; 2,14; 2,92; 3,50 mg/L), a curva de calibração obtida foi $Y=2e+06X - 13957$, com um R de 0,999

2.11 DETERMINAÇÃO DA COR

A determinação dos parâmetros colorimétricos nos extratos foi obtida no sistema CIELAB, utilizando colorímetro portátil marca Konica Minolta CR-400, calibrado com placa de porcelana branca (GOMEZ-PLAZA; MINANO; LOPEZ-ROCA, 2006).

2.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados foi realizada pela aplicação da Anova e o teste de Tukey visando identificar diferenças significativas entre as médias, usando o software Statistica® 5,0. O nível de significância considerado para a diferença entre as médias foi de 5 % ($p < 0,05$). Todas as análises químicas foram realizadas em triplicata e os resultados apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ANTOCIANINAS TOTAIS

Os teores de antocianinas totais dos extratos de resíduos de uva respeito as variedade Shiraz, Pinot Noir, Merlot e Cabernet Sauvignon, foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) entre todos os resíduos conforme pode se observar na Tabela 2, sendo que para o resíduo Shiraz e Pinot Noir o melhor tratamento foi a extração com etanol-acetona (70%) acidificada obtendo-se valores de 314 e 324,4 mg malvidin-3-glicosídeo/100 g de extrato (b.s.).

Tabela 2 - Conteúdo de antocianinas totais (AT) nos extratos dos resíduos procedentes da vinificação de diferentes variedades de uvas (*Vitis vinifera* L.).

T _i	mg mv-3-glc./100 g de extrato (b.s.)			
	Shiraz	Pinot Noir	Merlot	Cabernet Sauvignon
T ₁	47,83 $\pm$ 0,12 ^{Gd}	69,51 $\pm$ 0,17 ^{Gc}	659,14 $\pm$ 0,93 ^{Bb}	717,84 $\pm$ 0,24 ^{Ca}
T ₂	81,22 $\pm$ 0,71 ^{Ed}	94,24 $\pm$ 0,30 ^{Ec}	457,91 $\pm$ 0,17 ^{Fb}	743,23 $\pm$ 0,35 ^{Ca}
T ₃	314,08 $\pm$ 0,73 ^{Ad}	324,43 $\pm$ 0,37 ^{Ac}	629,13 $\pm$ 0,31 ^{Cb}	858,42 $\pm$ 0,29 ^{Ba}
T ₄	135,61 $\pm$ 0,12 ^{Bd}	164,61 $\pm$ 0,17 ^{Bc}	579,94 $\pm$ 0,21 ^{Db}	849,74 $\pm$ 0,18 ^{Ba}
T ₅	113,32 $\pm$ 0,26 ^{Dd}	137,73 $\pm$ 0,36 ^{Cc}	814,81 $\pm$ 0,88 ^{Ab}	1601,14 $\pm$ 0,92 ^{Aa}
T ₆	69,73 $\pm$ 0,36 ^{Fc}	72,33 $\pm$ 0,42 ^{Fc}	332,91 $\pm$ 0,36 ^{Gb}	465,92 $\pm$ 0,1 ^{Da}
T ₇	116,62 $\pm$ 0,1 ^{Cd}	124,24 $\pm$ 0,48 ^{Dc}	515,44 $\pm$ 0,37 ^{Eb}	705,82 $\pm$ 0,60 ^{Ca}

T_i: Tratamentos, T₁: Extração etanólico (70%) acidificado, T₂: Extração com acetona (70%) acidificada, T₃: Extração etanol-acetona (70%) acidificada, mistura tipo I, T₄: Extração etanol-acetona (70%) acidificada, mistura tipo II, T₅: Extração metanólica, T₆: Extração enzimática, T₇: Extração etanólica-enzimática. Valores seguidos da mesma letra maiúscula na coluna não diferem considerando os tratamentos e a mesma letra minúscula na linha os valores não diferem considerando os extratos das variedades de uva, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). mv-3-glc = malvidin-3-glicosídeo; b.s. = Base seca.

Esses resultados deve-se porque são variedades da baixa quantidade de antocianinas, mais apresentaram melhor polaridade com respeito ao etanol-acetona produzindo uma boa ligação de seus grupos hidroxilos, em comparação com os demais solventes. Nas variedades Merlot e Cabernet Sauvignon, o melhor método foi a extração metanólica onde se obteve a maior quantidade de antocianinas em comparação com as outras variedades. A comparação entre os tratamentos de extração mostrou que o método de extração metanólica dos extratos do resíduo da variedade Cabernet Sauvignon obteve a maior quantidade de antocianinas que foi de 1601,1 mg malvidin-3-glicosídeo/100 g de extrato (b.s.), o que pode justificar-se pela sua característica física, de apresentar uma tonalidade de cor vermelha muito intensa em comparação aos demais resíduos indicativo da alta presença de antocianinas. Além disso apresentaram alta polaridade da ligação dos grupos hidroxilos das antocianinas com o metanol produzindo alta solubilidade. Estes resultados em comparação com outras pesquisas, mostram que o valor de antocianinas do resíduo Cabernet Sauvignon tratadas por extração metanólica foi superior ao obtido por Cheng et al. (2012), em seu estudo sobre os métodos de extração com acetona, etanol e metanol de resíduos da variedade Pinot Noir (718, 663 e 601 mg de cianidina-3-glicosídeo/100 g de extrato seco de resíduos, respectivamente). Estes resultados foram semelhantes aos reportados por Rockenbach et al. (2011b), obtidos em extratos de resíduos de uva Merlot e Cabernet Sauvignon, valores que estiveram entre 827,49 e 1684,11 mg de malvidin-3-glicosídeo/100 g de extrato de resíduos, respectivamente).

3.2 FENÓLICOS TOTAIS

Na Tabela 3 que apresenta os valores de fenólicos totais nos resíduos da uva procedentes da vinificação, observou-se que existiu diferença significativa ($p < 0,05$) entre todos os tratamentos aplicados aos extratos dos resíduos e também entre as variedades de uva. Ademais pode se observar que o tratamento T₁ (Extração etanólico 70%) apresentou o menor valor de extração de fenólicos totais, enquanto o tratamento T₅ (Extração metanólica) apresentou a maior extração de fenólicos totais em todos os resíduos, onde a variedade Merlot foi a que apresentou a maior quantidade de fenólicos totais expressados em 9366,4 mg GAE/100 g de extrato, seguido de Cabernet Sauvignon e Shiraz (8157,8 e 7085,5 mg GAE/100 g de extrato, respectivamente). Esses resultados é produto da alta polaridade que existiu entre o metanol e as moléculas fenólicas, produzindo reações químicas de ligação entre seus grupos hidroxilos e obtendo um médio muito polar de alta solubilidade para a extração dos fenólicos.

Tabela 3 - Conteúdo de fenólicos totais (FT) nos extratos dos resíduos procedentes da vinificação de diferentes variedades de uvas (*Vitis vinifera* L.).

T _i	mg GAE/100 g de extrato (b.s.)			
	Shiraz	Pinot Noir	Merlot	Cabernet Sauvignon
T ₁	1835,35±1.31 ^{Gd}	3381,18±4.55 ^{Fb}	2136,60±4.74 ^{Fa}	2714,63±2.63 ^{Fc}
T ₂	4516,81±3.48 ^{Fa}	1996,58±1.31 ^{Gc}	1905,54±6.9 ^{Gd}	2593,50±7.89 ^{Gb}
T ₃	5773,68±6.57 ^{Cc}	5867,29±2.28 ^{Cd}	6540,73±2.63 ^{Da}	6073,72±2.28 ^{Cb}
T ₄	6397,38±4.74 ^{Bd}	6732,17±1.31 ^{Bc}	7319,06±1.31 ^{Ca}	6849,21±3.48 ^{Bb}
T ₅	7085,47±3.48 ^{Ac}	6924,01±5.26 ^{Ad}	9366,43±5.73 ^{Aa}	8157,84±1.31 ^{Ab}
T ₆	4953,58±3.94 ^{Ed}	5738,62±2.28 ^{Dc}	7413,97±4.74 ^{Ba}	6068,36±6.02 ^{Db}
T ₇	5476,94±7.32 ^{Db}	4903,70±4.55 ^{Ec}	5979,68±3.48 ^{Ea}	4851,07±5.26 ^{Ed}

T_i: Tratamentos, GAE: Equivalente de ácido gálico, T₁: Extração etanólico (70%) acidificado, T₂: Extração com acetona (70%) acidificada, T₃: Extração etanol-acetona (70%) acidificada, mistura tipo I, T₄: Extração etanol-acetona (70%) acidificada, mistura tipo II, T₅: Extração metanólica, T₆: Extração enzimática, T₇: Extração etanólica-enzimática. Valores seguidos da mesma letra maiúscula na coluna não diferem considerando os tratamentos e a mesma letra minúscula na linha os valores não diferem considerando os extratos das variedades de uva, pelo teste de Tukey (p<0.05), b.s. = Base seca

Os valores encontrados neste estudo estiveram dentro da faixa dos reportados por Oliveira et al. (2013) em extratos de bagaço de uva Merlot (1180 mg GAE/100 g b.s.) e Shiraz (6070 mg GAE/100 g b.s.). Nossos resultados foram menores a os valores obtidos por Cheng et al. (2012) frente a uma extração com metanol e acetona dos resíduos de Pinot Noir cujos valores foram 11250 mg GAE/100 g e 14830 mg GAE/100 g de extrato de resíduos respectivamente. Da mesma maneira quando se comparou com os resultados de Rockenbach et al. (2011) em extratos de resíduos da variedade Cabernet Sauvignon e Merlot (7475 e 4623 mg GAE/100 g de extrato dos resíduos b.s.) nossos resultados foram superiores. A variabilidade dos valores em comparação com outros autores, deveu-se à influência de vários factores como o clima, solo e práticas do cultivo.

3.3 FLAVONÓIDES TOTAIS

O conteúdo de flavonóides totais apresentados na Tabela 4, extraídas pelos métodos de extração sólido-líquido nos resíduos da uva procedentes da vinificação, observou-se que existiu diferença significativa (p<0,05) entre todos os extratos e os tratamentos de extração. Ademais pode se observar que no tratamento T₁ (Extração etanólico 70%) obteve-se a menor quantidade de flavonoides totais, devido a sua baixa polaridade do solvente. Por

enquanto a melhor extração foi o tratamento T₅ (Extração metanólica) onde os extratos apresentaram maior quantidade de flavonóides totais, assim mesmo dos métodos de extração a variedade Shiraz teve o maior conteúdo de flavonóides totais expressados em 192,2 mg QE/100 g de extrato de bagaço (b.s), seguido de Pinot Noir, Merlot e Cabernet Sauvignon (185,3; 175,2 e 162,5 mg QE/100 g de extrato de residuo b.s., respectivamente). Os altos valores de flavonóides nas variedades Shiraz e Pinot Noir deve-se posivélmente aos altos conteúdos de flavonóis (quercetina) e flavonas (catequinas) nos extratos. Além disso estes resíduos tiveram maior conteúdo de sementes as quais provavélmente são responsáveis desta composição. Os valores encontrados em nosso estudo de extração de compostos fenólicos foram muito superiores a os reportados por Ruberto et al. (2007) sobre os extratos de bagaço de uva Cabernet Sauvignon (52 mg GAE/g b.s.). Também os resultados deste estudo foram superiores aos reportados por Cassaza et al. (2010) em extratos de semente e casca da variedade Pinot Noir cujos valores foram de 138 e 28,7 mg GAE/100 g de extrato b.s.). Nossos resultados estiveram dentro da faixa dos reportados por Cheng et al. (2012) frente a metodos de extração com acetona, etanol e metanol, cujos valores foram 213,5, 177 e 125 mg QE/100 g de extrato de resíduos da variedade Pinot Noir, respectivamente.

Tabela 4 - Conteúdo de flavonóides totais (FVT) nos extratos dos resíduos procedentes da vinificação de diferentes variedades de uvas (*Vitis vinifera* L.).

T _i	mg QE/100 g de extrato (b.s.)			
	Shiraz	Pinot Noir	Merlot	Cabernet Sauvignon
T ₁	25,80±2,2 ^{Dd}	79,24±0,17 ^{Cb}	116,72±0,53 ^{Ca}	61,67±2,76 ^{Ec}
T ₂	111,47±0,59 ^{Bc}	166,56±0,62 ^{Aa}	147,39±0,37 ^{Bb}	161,95±0,19 ^{Aa}
T ₃	52,30±0,11 ^{Cd}	118,046±0,48 ^{Bc}	159,35±0,42 ^{Aa}	139,05±0,13 ^{Bb}
T ₄	97,48±0,57 ^{Bb}	162,28±3,55 ^{Aa}	170,80±0,65 ^{Aa}	116,48±0,43 ^{Ca}
T ₅	192,20±0,27 ^{Aa}	185,26±0,25 ^{Aa}	175,19±0,16 ^{Ab}	162,56±0,08 ^{Ac}
T ₆	28,19±0,26 ^{Dc}	44,73±0,13 ^{Db}	55,57±0,08 ^{Ea}	64,89±0,13 ^{Ea}
T ₇	90,08±0,46 ^{Ba}	92,53±0,08 ^{Ca}	79,99±0,31 ^{Db}	91,58±0,11 ^{Da}

T_i: Tratamentos, T₁: Extração etanólico (70%) acidificado, T₂: Extração com acetona (70%) acidificada, T₃: Extração etanol-acetona (70%) acidificada, mistura tipo I, T₄: Extração etanol-acetona (70%) acidificada, mistura tipo II, T₅: Extração metanólica, T₆: Extração enzimática, T₇: Extração etanolica-enzimática. Valores seguidos da mesma letra maiúscula na coluna não diferem considerando os tratamentos e a mesma letra minúscula na linha os valores não diferem considerando os extratos das variedades de uva, pelo teste de Tukey (p<0.05), QE = Quercetina, FVT= Flavonóides totais, b.s. = Base seca

Estes resultados foi produto das ligações químicas mediante pontes de hidrogênios que existiu entre o gram numero de grupos hidroxilas livres de álcool e da parte

glicosídicas dos flavonóides dos resíduos, frente a presença dos solventes especialmente do metanol, estes interagem para produzir meios de alta polaridade e solubilidade da fase orgânica, permitindo a separação ou extração dos flavonóides. Portanto a variabilidade dos resultados de antocianinas, fenólicos e flavonóides totais, deve-se ao efeito da polaridade dos solventes etanol, metanol e acetona frente a presença dos metabolitos secundários, expressando em alguns tratamentos de extração maiores quantidades que outros, sobre este mesmo efeito Lafka, Sinanoglou e Lazos (2007) reportou que os solventes metanol, etanol e acetona, permitiram nesse ordem a maior extração de fenólicos totais em resíduos da vinificação. Além disso, deve ter-se em conta que tem outros fatores que influenciam no valor quantitativo dos compostos fenólicos das bagas de uva e pelo tanto na biomassa dos resíduos da vinificação, como é o tamanho e quantidade das sementes, peles, estresse hídrico que é submetido a planta durante seu período de crescimento, solo, clima e práticas culturais (RODRIGUEZ et al., 2006)

3.4 ANÁLISE DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE - MÉTODO DPPH

O Análise da atividade antioxidante pelo método DPPH medida nos tratamentos de extração de compostos fenólicos dos resíduos da vinificação apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) entre todos os extratos e metodos de extração, conforme pode se observar na Tabela 5, onde o resíduo Merlot teve o valor mais alto, seguido de Cabernet Sauvignon, Shiraz e Pinot Noir, com valores de 5057,3; 4576,0; 4566,2 e 4511,6 (mg Eq-Trolox/100 g de amostra em base seca) respectivamente. Portanto o melhor método de extração foi o tratamento T₅ (Extração metanólica) por apresentar maior atividade antioxidante nos extratos. Este resultado indica que o radical (2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl) foi reduzido pelos fenólicos antioxidantes dos extratos, passando de um cor púrpura ate uma coloração amarela, além disso o radical livre teve a capacidade de reagir com os doadores de hidrogênio (H⁺) dos antioxidantes dos extratos dos resíduos, essa redução permitiu evitar sua oxidação. Os valores encontrados neste estudo foram inferiores aos reportados por Rockenbach et al. (2011b) sobre os extratos de bagaço de uva da variedade Cabernet Sauvignon e Merlot que tiveram valores de 12638 e 8209,8 mg Eq-Trolox/100 g de extrato respectivamente. Por outra parte comparadas com os reportados por Samavardhana et al. (2015) sobre seus extratos de resíduos de uva da variedade Rainha Preta com valores de 4090,8 mg TEAC/100 g de extrato, nosso resultados da extração metanólica foram superiores.

Estes resultados variam pela procedencia dos resíduos influenciando clima e solo, em seus compostos ativos que geram determinada atividade antioxidante.

Tabela 5 - Atividade antioxidante pelo método DPPH nos extratos de resíduos procedentes da vinificação de diferentes variedades de uvas (*Vitis vinifera* L.).

T _i	TEAC (mg eq-Trolox/100 g de extrato b.s.)			
	Shiraz	Pinot Noir	Merlot	Cabernet Sauvignon
T ₁	3131,64±0,21 ^{Ed}	3299,12±0,64 ^{Fb}	3574,34±0,24 ^{Fa}	3261,95±1,04 ^{Fc}
T ₂	3949,90±0,98 ^{Bc}	3964,12±0,64 ^{Bb}	3969,67±0,75 ^{Db}	3985,30±1,39 ^{Da}
T ₃	3488,66±1,51 ^{Dd}	3946,33±0,94 ^{Cc}	4333,64±1,36 ^{Ca}	4067,06±0,91 ^{Cb}
T ₄	3843,88±1,15 ^{Cd}	3880,28±0,42 ^{Dc}	4538,15±0,60 ^{Ba}	4214,06±1,18 ^{Bb}
T ₅	4566,22±2,77 ^{Ab}	4511,65±0,64 ^{Ac}	5057,25±0,48 ^{Aa}	4576,00±3,00 ^{Ab}
T ₆	2057,95±1,27 ^{Gd}	3351,05±5,18 ^{Ec}	3373,66±0,96 ^{Gb}	3828,69±2,10 ^{Ea}
T ₇	2559,99±3,19 ^{Fc}	3174,21±2,82 ^{Gb}	3707,40±1,60 ^{Ea}	2185,37±3,44 ^{Gd}

T_i: Tratamentos, T₁: Extração etanólico (70%) acidificado, T₂: Extração com acetona (70%) acidificada, T₃: Extração etanol-acetona (70%) acidificada, mistura tipo I, T₄: Extração etanol-acetona (70%) acidificada, mistura tipo II, T₅: Extração metanólica, T₆: Extração enzimática, T₇: Extração etanólica-enzimática. Valores seguidos da mesma letra maiúscula na coluna não diferem considerando os tratamentos e a mesma letra minúscula na linha os valores não diferem considerando os extratos das variedades de uva, pelo teste de Tukey (p<0.05), TEAC = Capacidade antioxidante equivalente a trolox, b.s. = Base seca

3.5 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE - MÉTODO ABTS

Os valores da medida da atividade antioxidante nos extratos pelo método ABTS apresentaram diferença significativa (p<0,05) entre todos os resíduos e métodos de extração, conforme pode se observar na Tabela 6, onde o melhor método de extração foi o tratamento T₅, porque neste tratamento todos os resíduos apresentaram maior valor de atividade antioxidante. Além disso, o resíduo da uva Merlot foi o que apresentou relativamente o maior valor igual a 4986,2 (mg Eq-Trolox/100 g de extrato em base seca), assim mesmo os que seguiram no orden quantitativo foram os resíduo da uva Shiraz, Pinot Noir e Cabernet Sauvignon, com 4367,6, 4176,5 e 3687,4 mg Eq-Trolox/100 g de extrato em base seca, respectivamente. Dos valores encontrados a parte da variedade Merlot o extrato do resíduo Shiraz também foi o que surpreendeu por apresentar alta capacidade antioxidante obtida em nosso estudo. Este resultado demonstrou que os antioxidantes dos extratos permitiram o decaimento do cátion-radical, produzido pela oxidação do ABTS (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiaziline-6-sulfonate), reagindo também energeticamente pela adição

dos antioxidantes que atuaram como um doador de átomo de hidrogênio. Os resultados da capacidade antioxidante dos resíduos do melhor método de extração de nosso estudo foram menores aos reportados por Rockenbach et al. (2011b) sobre os valores de 12135,5 e 7954 mg TEAC/100 g de extrato dos resíduos de uva Cabernet Sauvignon e Merlot. Também nossos resultados ao ser comparadas com os reportados por Samavardhana et al. (2015) foram menores frente ao valor de 7954 mg TEAC/100 g em base seca dos extratos de resíduos da uva Rainha Preta. Este resultado deve-se porque o alto conteúdo de antocianinas e flavonóides totais, nos extratos Merlot contribuíram a seu poder antioxidante.

Tabela 6 - Atividade antioxidante pelo método ABTS nos extratos de resíduos procedentes da vinificação de diferentes variedades de uvas (*Vitis vinifera* L.).

T _i	mg eq-Trolox/100 g extrato de bagaço (b.s.)			
	Shiraz	Pinot Noir	Merlot	Cabernet Sauvignon
T ₁	1486,63±3,46 ^{Ed}	3112,14±1,79 ^{Cc}	3327,18±1,31 ^{Da}	3216,91±1,46 ^{Gb}
T ₂	3546,53±3,89 ^{Ca}	3059,66±2,95 ^{Dc}	3063,72±1,72 ^{Fc}	3406,59±2,84 ^{Eb}
T ₃	3359,88±2,51 ^{Db}	2685,86±3,44 ^{Ec}	3647,74±2,05 ^{Ca}	3357,66±2,17 ^{Fb}
T ₄	3965,99±1,93 ^{Bb}	3541,38±2,03 ^{Bd}	4033,88±2,23 ^{Ba}	3600,09±4,37 ^{Bc}
T ₅	4367,68±2,31 ^{Ab}	4176,52±1,60 ^{Ac}	4986,26±2,03 ^{Aa}	3687,40±1,41 ^{Ad}
T ₆	1405,17±1,22 ^{Gd}	2270,11±2,90 ^{Gb}	2219,36±3,51 ^{Gc}	3507,77±2,48 ^{Da}
T ₇	2610,15±1,45 ^{Fc}	2567,05±2,13 ^{Fd}	3116,65±1,78 ^{Eb}	3536,22±2,79 ^{Ca}

T_i: Tratamentos, T₁: Extração etanólico (70%) acidificado, T₂: Extração com acetona (70%) acidificada, T₃: Extração etanol-acetona (70%) acidificada, mistura tipo I, T₄: Extração etanol-acetona (70%) acidificada, mistura tipo II, T₅: Extração metanólica, T₆: Extração enzimática, T₇: Extração etanólica-enzimática. Valores seguidos da mesma letra maiúscula na coluna não diferem considerando os tratamentos e a mesma letra minúscula na linha os valores não diferem considerando os extratos das variedades de uva, pelo teste de Tukey (p<0.05), TEAC = Capacidade antioxidante equivalente a trolox, b.s. = Base seca

3.6 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE – PODER REDUTOR

Os valores de atividade antioxidante pelo método do poder redutor medida nos extratos de compostos fenólicos dos resíduos da vinificação apresentaram diferenças conforme pode se observar na Tabela 7, onde o melhor método de extração foi o tratamento T₅ que foi o que apresentou os maiores valores. O comportamento redutor dos resíduos dentro deste método de extração mostrou que os resíduos da variedade Shiraz e Pinot Noir, foram os que apresentaram os maiores valores seguido de Merlot e Cabernet Sauvignon. Os resultados mais surpreendente foi que os extratos Pinot Noir e Shiraz, resultaram ser resíduos interessantes

por su alto poder e capacidade de reduzir radicais livres, isto ocorreu, na presença de 2,4,6-tripiridils-triazina, já que foi uma medida que forneceu uma estimativa da capacidade de um composto em reduzir Fe^{+3} (na forma de ferricianeto) para Fe^{+2} (forma ferrosa) na presença de um composto antioxidante através da mudança do cor amarelo da solução para tons verde azul, formando o composto azul da Prússia (Ferreira et al., 2007). Entretanto os resultados de nosso estudo comparados com os reportados por Baydar et al. (2011) em extratos de semente de uvas Cabernet Sauvignon o valor de absorbância (1,68) foi superior a nosso estudo. Em extratos de casca da mesma variedade o valor foi de 0,19, muito menor de nosso resultado e em vinhos com valores de 1,54 de absorbância ficou superior a nossos resultados. Destes resultados pode-se concluir que a semente tem boa capacidade antioxidante como poder redutor e que esta manifestação não é precisamente pelo valor da antocianina, mas pela presença de outros polifenóis como a catequina, epicatequina, galocatequina ou resveratrol.

Tabela 7 - Atividade antioxidante pelo método do Poder redutor nos extratos de resíduos procedentes da vinificação de diferentes variedades de uvas tintas (*Vitis vinifera* L.).

T _i	Abs			
	Shiraz	Pinot Noir	Merlot	Cabernet Sauvignon
T ₁	0,507±0,038 ^{Cc}	0,633±0,027 ^{Cb}	0,724±0,012 ^{Aa}	0,527±0,014 ^{Cc}
T ₂	0,638±0,046 ^{Bc}	0,839±0,018 ^{Aa}	0,732±0,043 ^{Ab}	0,742±0,017 ^{Ab}
T ₃	0,613±0,032 ^{Bc}	0,753±0,06 ^{Ba}	0,839±0,02 ^{Aa}	0,646±0,057 ^{Bb}
T ₄	0,637±0,066 ^{Bc}	0,825±0,059 ^{Aa}	0,844±0,044 ^{Aa}	0,709±0,016 ^{Ab}
T ₅	0,941±0,045 ^{Aa}	0,911±0,014 ^{Aa}	0,812±0,039 ^{Ab}	0,705±0,041 ^{Ac}
T ₆	0,141±0,013 ^{Eb}	0,212±0,030 ^{Da}	0,171±0,009 ^{Ca}	0,202±0,034 ^{Ea}
T ₇	0,445±0,013 ^{Db}	0,556±0,012 ^{Ca}	0,602±0,09 ^{Ba}	0,433±0,014 ^{Dc}

T_i: Tratamentos, T₁: Extração etanólico (70%) acidificado, T₂: Extração com acetona (70%) acidificada, T₃: Extração etanol-acetona (70%) acidificada, mistura tipo I, T₄: Extração etanol-acetona (70%) acidificada, mistura tipo II, T₅: Extração metanólica, T₆: Extração enzimática, T₇: Extração etanólica-enzimática. Valores seguidos da mesma letra maiúscula na coluna não diferem considerando os tratamentos e a mesma letra minúscula na linha os valores não diferem considerando os extratos das variedades de uva, pelo teste de Tukey (p<0.05).

Sobre este resultado os autores mencionados anteriormente, consideram que suas amostras têm alto potencial antioxidante, tomando conta esta afirmação nos extratos de resíduos de uva Merlot e Pinot Noir, seriam também amostras com alto potencial antioxidante. A variabilidade dos valores nos métodos de DPPH, ABTS e poder redutor, devem-se provavelmente as características de cada amostra onde eles diferem ao tipo de

cultivo, variedade, solos e aspectos climáticos. Além alguns variedades têm maior numero e tamanho de sementes, isso leva a ter uma diferencia no conteúdo de antocianinas totais, fenólicos totais, flavonóides totais e capacidade antioxidante. Os compostos fenólicos estão distribuídos em diferentes partes da uva, ficando em quantidades diferentes nos extratos dos resíduos da uva. Quando são extraídas com solventes, a polaridade é importante para sua manifestação de extrair maior quantidade de compostos fenólicos, pelo mesmo os componentes de casca e semente vão influir na variabilidade dos testes.

3.7 ANÁLISE DE COR

Na Tabela 8, apresentam-se os valores médios e desvio padrão dos parâmetros de cor CIELab, L^* , a^* , b^* , ângulo *Hue* e Cromaticidade determinados nos resíduos de diferentes variedades de uva procedentes da vinificação.

Observou-se que os valores do parâmetro (a^*) não apresentaram diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) entre os métodos de extração e extratos dos resíduos uva Merlot e Cabernet Sauvignon, sobre a escala do parâmetro (b^*) o resíduo da variedade Merlot teve diferença significativa com as demais amostras o que indicou uma maior tendência da coloração menos amarelo. Em todos os tratamentos, os extratos de Shiraz e Pinot Noir apresentaram a mais alta luminosidade (L^*), e os de Merlot e Cabernet Sauvignon tiveram valores menores, sendo que o extrato do resíduo de Merlot resultou ser a amostra mais escura.

O valor da tonalidade foi maior nos extratos de Shiraz e Pinot Noir, assim mesmo foi menor em Merlot e Cabernet Sauvignon, o que indica que a menor tonalidade levou a uma maior coloração vermelha. Os extratos dos resíduos Merlot e Cabernet Sauvignon apresentaram os valores de coordenada cromática (a^*) menores frente as outras variedades e os menores valores de b^* indicam uma coloração menos amarelo, estes foram observados nos métodos de extração de compostos fenólicos especialmente em Merlot e Cabernet Sauvignon. Dos resultados pode-se determinar que os extratos dos resíduos Merlot e Cabernet Sauvignon, apresentaram a maior coloração vermelha característica que da como indicativo a presença quantitativa de antocianinas. Segundo trabalhos realizados por Cliff, King e Schlosser (2007) e Gomez-Plaza, Minano e Lopez-Roca (2006) a maior concentração de antocianinas pode ter contribuído para que os produtos e subprodutos de uvas apresentassem maiores valores de cromaticidade e tonalidade de cor.

Tabela 8 - Parâmetros de cor nos resíduos da vinificação de diferentes variedades de uva.

T _i	Resíduos	a*	b*	L*	(H°)	(C*)
T ₁	Shiraz	18,91±0,39 ^{Ba}	476±0,17 ^{Ca}	16,28±0,31 ^{Ba}	14,13±0,19 ^{Ba}	19,50±0,42 ^{Ba}
	Pinot Noir	15,14±0,50 ^{Bb}	3,20±0,19 ^{Cb}	15,65±0,22 ^{Ba}	11,95±0,30 ^{Ca}	15,48±0,53 ^{Bb}
	Merlot	2,96±0,35 ^{Ed}	0,50±0,17 ^{Dc}	13,55±1,01 ^{Bb}	9,48±2,02 ^{Cb}	3,01±0,37 ^{Ed}
	Cabernet S.	6,98±0,24 ^{Cc}	0,90±0,17 ^{Cc}	14,23±0,85 ^{Bc}	7,35±1,13 ^{Cc}	7,04±0,25 ^{Cc}
T ₂	Shiraz	9,08±0,49 ^{Ca}	1,65±0,21 ^{Da}	14,48±0,69 ^{Ca}	10,25±0,78 ^{Ca}	9,23±0,51 ^{Da}
	Pinot Noir	8,58±0,27 ^{Ca}	1,43±0,08 ^{Ca}	14,95±0,30 ^{Ba}	9,45±0,50 ^{Ca}	8,69±0,27 ^{Cb}
	Merlot	6,93±0,46 ^{Cb}	0,72±0,13 ^{Cb}	15,00±0,91 ^{Aa}	5,91±0,79 ^{Db}	6,96±0,47 ^{Cc}
	Cabernet S.	5,92±0,19 ^{Cc}	0,68±0,08 ^{Cb}	15,56±0,41 ^{Aa}	6,55±0,56 ^{Cb}	5,96±0,20 ^{Cd}
T ₃	Shiraz	11,1±0,67 ^{Ca}	2,55±0,37 ^{Da}	16,90±0,77 ^{Ba}	12,91±1,05 ^{Ca}	11,36±0,74 ^{Da}
	Pinot Noir	8,90±0,63 ^{Cb}	1,77±0,10 ^{Cb}	15,54±0,22 ^{Ba}	11,29±0,55 ^{Ca}	9,08±0,63 ^{Cb}
	Merlot	4,53±0,50 ^{Cc}	0,45±0,13 ^{Dc}	15,34±0,52 ^{Ab}	5,59±1,12 ^{Db}	4,45±0,50 ^{Dc}
	Cabernet S.	5,50±0,24 ^{Dc}	0,69±0,07 ^{Cc}	15,62±0,37 ^{Ab}	7,22±1,04 ^{Cb}	5,54±0,23 ^{Cc}
T ₄	Shiraz	7,67±0,19 ^{Db}	1,49±0,10 ^{Da}	13,72±0,07 ^{Cb}	11,04±0,97 ^{Ca}	7,81±0,16 ^{Eb}
	Pinot Noir	10,21±0,37 ^{Ca}	1,74±0,22 ^{Ca}	14,82±0,19 ^{Ba}	9,71±1,36 ^{Ca}	10,36±0,35 ^{Ca}
	Merlot	4,47±0,20 ^{Dd}	0,48±0,08 ^{Db}	13,29±0,16 ^{Cb}	6,19±1,02 ^{Dc}	4,50±0,20 ^{Dd}
	Cabernet S.	5,21±0,19 ^{Dc}	0,66±0,08 ^{Cb}	13,80±0,50 ^{Cb}	7,21±0,69 ^{Cb}	5,26±0,19 ^{Dc}
T ₅	Shiraz	6,57±1,88 ^{Ea}	1,48±0,07 ^{Da}	11,88±0,70 ^{Da}	13,32±3,37 ^{Ca}	6,74±1,84 ^{Fa}
	Pinot Noir	4,54±0,39 ^{Ea}	0,94±0,18 ^{Db}	12,35±0,86 ^{Da}	11,66±1,64 ^{Ca}	4,63±0,41 ^{Da}
	Merlot	4,25±0,22 ^{Da}	0,98±0,06 ^{Cb}	10,70±0,26 ^{Eb}	12,97±0,99 ^{Aa}	4,36±0,21 ^{Da}
	Cabernet S.	3,48±0,34 ^{Eb}	0,76±0,14 ^{Cb}	11,68±0,24 ^{Ea}	12,20±1,17 ^{Ba}	3,57±0,36 ^{Eb}
T ₆	Shiraz	5,79±0,11 ^{Ec}	14,42±0,13 ^{Aa}	30,22±0,26 ^{Aa}	68,16±0,23 ^{Aa}	15,54±0,16 ^{Ca}
	Pinot Noir	6,37±0,23 ^{Dc}	12,75±0,13 ^{Ab}	22,63±0,22 ^{Ab}	63,49±0,76 ^{Ab}	14,25±0,19 ^{Bb}
	Merlot	11,43±0,33 ^{Ba}	3,02±0,12 ^{Ad}	12,09±0,46 ^{Cd}	14,79±0,16 ^{Ad}	11,82±0,35 ^{Bc}
	Cabernet S.	10,66±0,20 ^{Bb}	6,46±0,18 ^{Ac}	17,01±0,39 ^{Ac}	31,24±0,36 ^{Ac}	12,46±0,26 ^{Bc}
T ₇	Shiraz	22,31±0,19 ^{Aa}	7,34±1,09 ^{Ba}	14,07±0,17 ^{Ca}	18,21±2,66 ^{Ba}	23,50±0,18 ^{Aa}
	Pinot Noir	21,33±1,88 ^{Aa}	7,04±1,67 ^{Ba}	14,46±0,44 ^{Ca}	18,15±3,17 ^{Ba}	22,49±2,19 ^{Aa}
	Merlot	13,49±0,29 ^{Ab}	2,53±0,06 ^{Bb}	11,65±0,21 ^{Db}	10,64±0,26 ^{Bc}	13,73±0,29 ^{Ab}
	Cabernet S.	19,63±1,38 ^{Aa}	4,83±0,54 ^{Ba}	12,41±0,86 ^{Db}	13,80±0,57 ^{Bb}	20,21±1,47 ^{Aa}

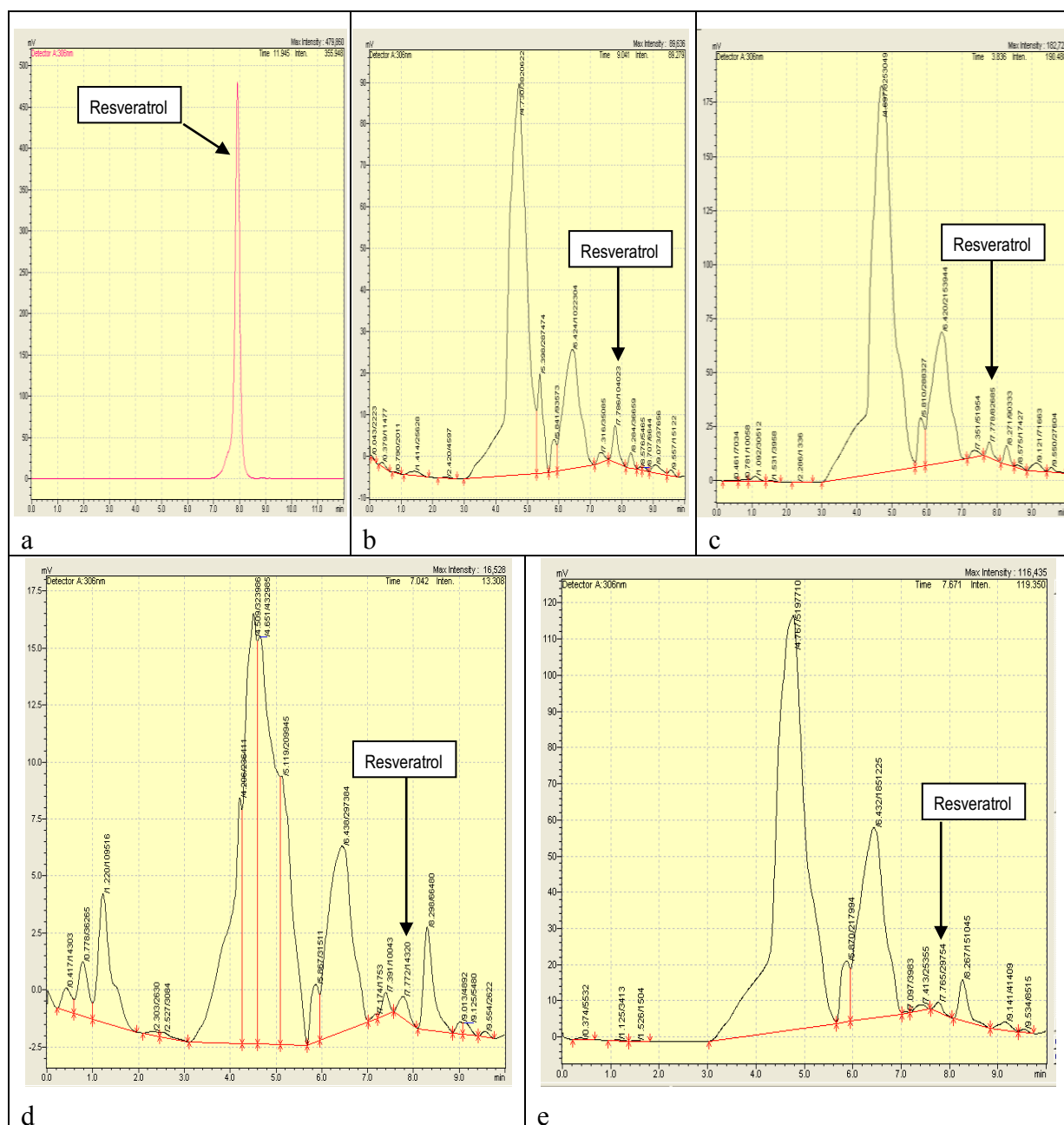
T_i: Tratamentos, T₁: Extração etanólico (70%) acidificado, T₂: Extração com acetona (70%) acidificada, T₃: Extração etanol-acetona (70%) acidificada, mistura tipo I, T₄: Extração etanol-acetona (70%) acidificada, mistura tipo II, T₅: Extração metanólica, T₆: Extração enzimática, T₇: Extração etanólica-enzimática. Valores seguidos da mesma letra maiúscula na coluna não diferem considerando os tratamentos e a mesma letra minúscula na linha os valores não diferem considerando os extratos das variedades de uva, pelo teste de Tukey (p<0.05), C*= Cromaticidade; H°= Ângulo Hue (Tonalidade).

3.8 TRANS-RESVERATROL

No cromatograma do *trans*-resveratrol da Figura 1 apresenta-se os picos do *trans*-resveratrol e os picos dos extratos dos resíduos da variedade Shiraz, Pinot Noir, Merlot e Cabernet Sauvignon, procedentes da extração metanólica acidificado. O tempo de retenção foi de 7,8 minutos, além disso, os picos formados foram produto do conteúdo de *trans*-resveratrol e de seu fator de diluição utilizados em cada um dos extratos, onde o pico do

resveratrol no extrato Shiraz foi o mais pronunciado devido a seu maior conteúdo de *trans*-resveratrol.

Figura 1 - Cromatograma-HPLC do *trans*-resveratrol para T₅ (extração metanólica acidificada dos resíduos da vinificação). Resveratrol standard (a), Shiraz (b), Pinot Noir(c), Merlot(d) e Cabernet Sauvignon (e).



O conteúdo de *trans*-resveratrol medido no tratamento de extração com metanol (T₅) dos resíduos da vinificação apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) entre todos os resíduos sendo que os resíduos Pinot Noir e Cabernet Sauvignon, não apresentaram

diferença estatística entre os extratos, conforme pode se observar na Tabela 9. O extrato de resíduo da uva Shiraz foi o que apresentou o valor mais alto de 3,7 (mg *trans*-resveratrol/100 g de extrato em base seca), assim mesmo os que seguiram na ordem quantitativa foi o resíduo da uva Pinot noir, Cabernet Sauvignon e Merlot, com 2,6, 2,3 e 0,7 mg *trans*-resveratrol/100 g de extrato em base seca, respectivamente. Os valores encontrados em nosso estudo de extração de *trans*-resveratrol foram inferiores a os reportados por Rockenbach et al. (2011) em bagaços da vinificação de uva Cabernet sauvignon e Merlot (4,02 e 6,4 mg *trans*-reveratrol/100 g b.s.). Mas nossos resultados foram superiores a os reportados por Liu et al. (2013) em extratos de cascas de uva “*Vitis vinifera*” da variedade Saint-Emilion (0,62 mg *trans*-reveratrol/100 g b.s) e foram inferiores aos obtidos por Sun et al. (2006) em extratos de sementes de uvas da variedade Syrah (4,02 a 6,8 mg *trans*-vereratrol/100 g b.s.).

Tabela 9 – Conteúdo de *trans*-resveratrol nos extratos metanólicos dos resíduos da vinificação de diferentes variedades de uvas tintas (*Vitis vinifera* L.).

Resíduos	<i>Trans</i> -resveratrol (mg/100 g de extrato em b.s.).
Shiraz	3,71 ± 0,11 ^a
Pinot Noir	2,63 ± 0,24 ^b
Merlot	0,70 ± 0,02 ^c
Cabernet Sauvignon	2,30 ± 0,01 ^b

Resultados são expressos da média ± desvio padrão (n = 3); Médias com letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes no teste de Tukey (p < 0,05).

Destes resultados obtidos pode se mencionar que os resíduos tiveram uma variabilidade quantitativa de *trans*-resveratrol, sendo que as variedades Shiraz, Pinot Noir e Cavernet Sauvignon, apresentaram resíduos com maior quantidade de *trans*-resveratrol, o alto conteúdo de *trans*-resveratrol nos extratos Shiraz e Pinot, foi devido à que estas variedades naturalmente contem maior massa de partículas de sementes em seus resíduos, pelo tanto estes componentes nos extratos dos resíduos foram os que contribuíram em sua boa caracterização fenólica e alto valor de *trans*-resveratrol. Do método de extração sólido-líquida mediante metanol acidificado acredita-se que este solvente teve alta polaridade química frente aos compostos fenólicos dos extratos de resíduos da vinificação, por que permitiu extrair maior quantidade de compostos antioxidantes no especial do *trans*-

resveratrol, pelo tanto estes extratos podem se considerar como uma boa fonte de polifenóis constituídos por *trans*-resveratrol (CHENG et al., 2012; IACOPINI et al., 2008).

4 CONCLUSÃO

O melhor método de extração sólido-líquido dos compostos fenólicos foi o tratamento com metanol acidificado (98%; pH 1,5; 24 horas) devido a polaridade química do solvente e os princípios ativos dos resíduos da vinificação.

O extrato dos resíduos da vinificação das variedades Cabernet Sauvignon e Merlot, apresentaram maior conteúdo de antocianinas e fenólicos totais, com a extração metanólica, esta característica foi demonstrada pelos ótimos parâmetros cromáticos de cor, onde estes resíduos tiveram uma alta tonalidade de cor vermelha.

O conteúdo de flavonóides totais foi maior nos extratos dos resíduos Shiraz e Pinot Noir. O alto valor da atividade antioxidante pelos métodos de DPPH, ABTS e poder redutor dos extratos Merlot e Cabernet, foi devido a alta presença de antocianinas e a atividade antioxidante dos extratos Shiraz e Pinot Noir, foi consequência da alta presença dos flavonóides totais e *trans*-resveratrol, responsáveis da boa capacidade de sequestrar radicais livres ABTS e DPPH.

O extrato metanólico acidificado do resíduo da variedade Shiraz foi a que apresentou o maior conteúdo de *trans*-resveratrol.

Os resultados deste estudo confirmam que os extratos dos resíduos Shiraz, Pinot Noir e Cabernet Sauvignon, podem ser considerados boas fontes naturais de *trans*-resveratrol. Além disso, eles são uma fonte rica de fenólicos, flavonóides totais e de alta capacidade antioxidante que poderiam ser usadas como aditivos em suplementos dietéticos, alimentos nutracêuticos e medicamentos.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARVANITOYANNIS, I.; LADAS, D.; MAVROMATIS, A. Wine waste treatment methodology. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 41, p. 1117-1151, 2006.

ATANACKOVIĆ, M.; PETROVIĆ, A.; JOVIĆ, S.; GOJKOVIĆ-BUKARICA, L.; BURSÁČ, M.; CVEJČIĆ, J. Influence of winemaking techniques on the resveratrol content, total phenolic content and antioxidant potential of red wines. **Food Chemistry**, v. 131, p. 513-518, 2012.

BAYDAR, N. G.; BABALIK, Z.; TÜRK, F. H.; ÇETİN E. S. Phenolic Composition and Antioxidant Activities of Wines and Extracts of Some Grape Varieties Grown in Turkey. **Journal of Agricultural Sciences**, v. 17 p. 67-76, 2011.

BUCIC-KOJIC, A.; PLANINIC, M.; TOMAS, S.; BILIC, M.; VELIC, D. Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grapes seeds. **Journal of Food Engineering**, v. 81, n. 1, p. 236-242, 2007.

CACACE, J. E. ; MAZZA, G. Optimization of extraction of anthocyanins from black with aqueous ethanol. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 1, p. 240-248, 2003.

CASAZZA, A.; ALIAKBARIAN, B.; MANTEGNA, S.; CRAVOTTO, G.; PERGO, P. Extraction of phenolics from *Vitis vinifera* wastes using non-conventional techniques. **Journal of food Engineering**, v. 100, p. 50-55, 2010.

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

CISSÉ, M.; BOHUON, P.; SAMBE, F.; KANE, C.; SAKHO, M.; DORNIER, M. Aqueous extraction of anthocyanins from Hibiscus sabdariffa: Experimental Kinetics and Modeling. **Journal of Food Engineering**, v. 109, p. 16-21, 2012.

CLIFF, M. A.; KING, M. C.; SCHLOSSER, J. Anthocyanin, phenolic composition, colour measurement and sensory analysis of BC commercial red wines. **Food Research International**, v. 40, p. 92-100, 2007.

FERREIRA, I.; BAPTISTA, P.; VILAS-BOAS, M.; BARROS, L. Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1511-1516, 2007.

FERRI, M.; TASSONI, A.; FRANCESCHETTI, M.; RIGHETTI, L.; NALDRETT, M.; BAGNI, N. Chitosan treatment induces changes of protein expression profile and stilbene distribution in *Vitis Vinifera* cell suspensions. **Proteomics**, v. 9, p. 610-624. 2009.

FONTANA, A. R.; ANTONIOLLI, A.; BOTTINI, R. Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: extraction, characterization, and biotechnological applications of phenolics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 8987–9003, 2013.

GAMBUTI, A.; STROLLO, D.; UGLIANO, M.; LECCE, L.; MOIO, L. Transresveratrol, quercetin, catechin and epicatechin content in south Italian monovarietal wines: relationship with maceration time and marc pressing during winemaking. **J. Agric. Food Chemistry**, v. 52, p. 5747-5751. 2004.

GATTO, P.; VROVSEK, U.; MUTH, J.; SEGALA, C.; ROMUALDI, C.; FONTANA, P.; PRUEFER, D.; STEFANINI, M.; MOSER, C.; MATTIVI, F.; VELASCO, R. Ripening and genotype control stilbene accumulation in healthy grapes. **J. Agric. Food Chemical**, v. 56, p. 11773-11785, 2008.

GARRIDO, J.; BORGES, F. Wine and grape polyphenols - A chemical perspective. **Food Research International**, v. 54, n. 2, p. 1844-1858. 2013.

GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Anthocyanins, Characterization and Measurement with UV-Visible Spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, v. 2, p. 1-13. 2001.

GOMEZ-PLAZA, E.; MINANO, A.; LOPÉZ-ROCA, J. M. Comparison of chromatic properties, stability and antioxidant capacity of anthocyanin-based aqueous extracts from grape pomace obtained from different vinification methods. **Food Chemistry**, v. 97, n.1, p. 87-94, 2006.

GORINSTEIN, S.; CVIKROVA, M.; MACHACKOVA, I.; HARUENKIT R.; PARK, J.; JUNG, S. Characterization of antioxidant compounds in Jaffa sweeties and White grape fruits. **Food Chemistry**, v. 84, p. 503-510, 2004.

IACOPINI, P.; BALDI, M.; STORCHI, P.; SEBASTIANI, L. Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro antioxidant activity and interactions. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, p. 589-598, 2008.

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

LAPORNIK, B.; PROSEK, M.; WONDRA, A. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. **Journal of Food Engineering**, Slovenia. v. 71, p. 214-222. 2005.

LIU, C.; WANG, L.; WANG, J.; WU, B.; LIU, W.; FAN, P.; LIANG, Z.; LI, S. Resveratrol in Vitis berry skins and leaves: Their extraction and analysis by HPLC. **Journal of Food Chemistry**, v. 136, p. 643-649, 2013.

MACEDO, L. F.; ROGERO, M.; GUIMARAES, J.; GRANATO, D.; LOBATO, L.; CASTRO, I. A. Effect of red wines with different in vitro antioxidant activity on oxidative stress of high-fat diet rats. **Food Chemistry**, v. 137, n. 1, p. 122-129, 2013.

MANTELL, C.; RODRIGUEZ, M.; MARTINEZ DA OSSA, E. Semi-batch extraction of anthocyanins from red grape pomace in packed beds: experimental results and process modeling. **Chemical Engineering Science**, v. 57, p. 3831-3838, 2002.

MITIĆ, M.; SOUQUET, J.; OBRADOVIĆ, M.; MITIĆ, S. Phytochemical profiles and antioxidant activities of Serbian table and wine grapes. **Food Science and Biotechnology**, v. 21, p. 1619-1626, 2012.

MOON, J. K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant assays for plant and food components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 1655-1666, 2009.

NENADIS, N.; WANG, L. F.; TSIMIDOU, M.; ZHANG, H. Y. Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS^{•+} assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 4669-4674, 2004.

OLIVEIRA, D.; SALVADOR, A.; SMÃNIA, A.; SMÃNIA, E.; MARASCHIN, M.; FERREIRA, S. Antimicrobial activity and composition profile of grape (*Vitis vinifera*) pomace extracts obtained by supercritical fluids. **Journal Of Biotechnology**, v. 164, n. 3, p. 423–432, 2013.

PINELO, M.; RUBILAR, M.; JEREZ, M.; SINEIRO, J.; NÚÑEZ, M. Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. **Journal of the Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 2111-2117, 2005.

PINELO, N.; FABBRO, P.; MANZOCCO, L. Optimization of continuous phenol extraction from *Vitis vinifera* by products. **Food Chemistry**, v. 92, p. 109-117, 2005.

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

RODRIGUEZ, R.; ROMERO, R.; CHACON, J.; MARTINEZ, J.; GARCIA, E. phenolics compounds in skins and of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 687-693, 2006.

RODRIGUEZ-SAONA, L.E.; WROLSTAD, R.R. Extraction, isolation, and purification of anthocyanins. **Currents Protocols in Food Analytical Chemistry**, p. F 1.1.1-F1.1.11, 2001.

ROMERO-PEREZ, A.; LAMUELA-RAVENTOS, R.; ANDRE-LACUEVA, C.; DA TORRE-BORONAT, C. Method for the quantitative extraction of resveratrol and piceid isomers in grape Berry skins. Effect of powdery mildew on the stilbene content. **J. Agric. Food chemistry**, v. 49, p. 210-215, 2001.

RUBERTO, G.; RENDA, A.; DAQUINO, C.; AMICO, V.; SPATAFORA, C.; TRINGALI, C.; DE TOMMASI, N. Polyphenol constituents and antioxidant activity of grape pomace extracts from five Sicilian red grape cultivars. **Food Chemistry**, Barking, v. 100, p. 203-210, 2007.

SAMAVARDHANA, K.; SUPAWITITPATTANA, P.; JITTREPOTCH, N., ROJSUNTORNKITTI, K.; KONGBANGKARD, T. Effects of extracting conditions on phenolic compounds and antioxidant activity from different grape processing byproducts. **International Food Research Journal**, v. 22, n. 3, p. 1169-1179, 2015.

SILVA, V.; GENTA, G.; MÖLLER, M.; MASNER, M.; THOMSON, L.; ROMERO, N.; RADI, R.; FERNANDES, D.; LAURINDO, F.; HEINZEN, H.; FIERRO, W.; DENICOLA, A. Antioxidant activity of uruguayan propolis. In vitro and cellular assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 12, p. 6430-6437, 2011.

SINEIRO, D.; RUBILAR, M.; SÁNCHEZ, S.; JEREZ, J.; PINELO, M.; COSTOYA, N.; NÚÑEZ, M. Polyphenols from plant materials: extraction and antioxidant power. **J. Agric. Food Chemistry**, v. 7, n. 8, p. 3210-3216, 2008.

SPIGNO, G.; DE FAVERI, D. Antioxidants from grape stalks and Marc: Influence of extraction procedure on yield, purity and antioxidant Power of the extracts. **Journal of Food Engineering**, v. 78, p. 793-801, 2007.

SURVESWARAN, S.; CAI, Y. Z.; CORKE, H.; SUN, M. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. **Food Chemistry**, v. 102, n. 3, p. 938-953, 2007.

SUN, B.; RIBES, A. M.; LEANDRO, M. C.; BELCHIOR, A. P.; SPRANGER, M. I. Stilbenes: quantitative extraction from grape skin, contribution of grape solids to wine and variation during wine maturation. **Analytica Chimica Acta**, v. 563, p. 382-390, 2006.

TSENG, A.; ZHAO, Y. Wine grape pomace as antioxidant dietary fibre for enhancing nutritional value and improving storability of yogurt and salad dressing. **Food Chemistry**, v. 138, p. 356–365, 2013.

VITRAC, X.; BORNET, A.; VANDERLINDE, R.; VALLS, J.; RICHARD, T.; DELAUNAY, J.; MERILLON, J.; TEISSEDE, P. Determination of stilbenes (δ -viniferin, *trans*-astringin, *trans*-piceid, *cis* and *trans*-resveratrol, ϵ -viniferin) in Brazilian wines. **J. Agric. Food Chemistry**, v. 53, p. 5664-5669, 2005.

XIANG, L.; XIAO, L.; WANG, Y.; LI, H.; HUANG, Z.; HE, X. Health benefits of wine: don't expect resveratrol too much. **Food Chemistry**, v.156, n. 1, p. 2582–63, 2014.

XU, C.; ZHANG, Y.; CAO, L.; LU, J. Phenolic compounds and antioxidant properties of different grape cultivars grown in China. **Food Chemistry**, v. 119, p. 1557-1565, 2010.

YANG, J.; MARTINSON, T.; LIU, R. Phytochemical profiles and antioxidant activities of wine grapes. **Food Chemistry**, v.116, p.332-339, 2009.

YOU-TUNG, L.; CHENG-CHENG, P.; SHWU-TZY, W.; CHI-YUE, C. Effect of Different Germination Conditions on Antioxidative Properties and Bioactive Compounds of Germinated Brown Rice. **Journal Bio Med Research International**, v. 2015, p. 1-10, 2015.

ARTIGO III

AVALIAÇÃO FÍSICA, QUÍMICA E BIOLÓGICA DE NANOPARTÍCULAS DE EXTRATOS FENÓLICOS DE RESÍDUOS DA VINIFICAÇÃO.

RESUMO

Os extratos aquosos obtidos dos resíduos da vinificação são boa fonte de compostos fenólicos e possuem atividade antioxidante, com poderosos efeitos biológicos sobre a saúde, portanto manter a estabilidade destas moléculas e ter uma aplicação biológica é um rol da investigação científica. O objetivo do presente estudo foi determinar a nanoencapsulação de compostos fenólicos procedentes dos resíduos da vinificação, a avaliação *in-vitro* da atividade antioxidante e da digestão gastro-intestinal simulada e o efeito sobre o estresse oxidativo e a longevidade utilizando o nematóide *Caenorhabditis elegans*. Primeiro foram formulados diferentes tipos de nanopáticas obtidas pelos métodos de secagem por atomização, liofilização e por emulsão de baixa energia. Nas nanopáticas foi determinado o conteúdo de antocianinas, fenólicos e flavonóides totais. Avaliou-se *in vitro* a atividade antioxidante, determinou-se o tamanho e a morfologia das partículas, assim como o índice de polidispersão e potencial zeta das mesmas. Após a avaliação dos resultados determinou-se que a melhor bioatividade correspondeu as nanoesferas formulados com os extratos Shiraz e Merlot, utilizando maltodextrina e secado por atomização. Na segunda parte realizou-se a digestão gastro-intestinal *in vitro* e como terceira parte deste trabalho avaliou-se o efeito biológico *in vivo* em organismos modelo de *C. elegans* medindo o estresse oxidativo e a longevidade. As nanoesferas apresentaram proteção contra a liberação dos compostos fenólicos e antioxidantes dentro da boca, estômago e intestino. Os efeitos biológicos *in vivo* verificaram que as nanoesferas de T₂ nas concentrações de 50, 100 e 150 mg/mL atuaram como pro-oxidantes, não tiveram resistência ao estresse oxidativo e a longevidade ficou por baixo do controle. No entanto, as nanoesferas de T₉ nas concentrações de 50, 100 e 150 mg/mL, apresentaram alta resistência ao estresse oxidativo e uma alta longevidade dos *C. elegans*, com uma sobrevivência máxima de 37 dias e um 27,03% de redução de sobrevivência media.

Palavras-chave: ROS. *Caenorhabditis elegans*. Nanocápsulas. Fenólicos. Antioxidantes. Longevidade.

1 INTRODUÇÃO

Existem compostos fenólicos presentes em diferentes fontes vegetais como frutas, legumes e plantas medicinais, demonstradas *in vitro* e *in vivo* que tem importantes propriedades biológicas e que atuam fisiologicamente para prevenir doenças nos seres humanos, estes metabólitos estão ubicadas em diferentes partes da planta: folhas, talos, polpas e sucos das frutas, casca e sementes. A uva é uma fruta que apresenta todas estas características, esta demonstrado cientificamente que contem alta quantidade de fitoquímicos na casca e semente, mas variam muito de acordo a variedade e procedência dos cultivos, quando são tratados na elaboração de vinhos. De 100 kg de uva 20,59 % são gerados como resíduos formados principalmente pela casca e sementes, e os principios ativos destes resíduos não são aproveitados (ARVANITOYANNIS; LADAS; MAVROMATIS, 2006; FONTANA; ANTONIOLLI; BOTTINI, 2013; TSENG; ZHAO, 2013). As variedades *Vitis vinifera*, possuem grandes quantidades de metabólitos secundários que estão ubicadas nas estruturas celulares das cascas e sementes de uvas, que ainda permanecem nos resíduos depois da elaboração de vinhos. Pesquisas sobre a extração dos compostos fenólicos destes resíduos indicam que a variedade Shiraz e Merlot possuem alto conteúdo de fenólicos e boas propriedades antioxidantes (XIANG et al., 2014). Estas moléculas são do grupo não-flavonóides que compreendem (ácidos fenólicos, benzóicos e cinâmicos, e outros derivados fenólicos como o *trans* e *cis* resveratrol) e os compostos do grupo dos flavonóides (flavonas, flavononas, isoflavonas, flavanóis como a catequinas, epicatequinas e antocianinas), considerados como potentes antioxidantes, seqüestrantes de radicais livres, quelantes de metais, antimicrobianos, inibidores da peroxidação. Além disso podem atuar contra o câncer e inibindo a proliferação de células tumorais (MACEDO et al., 2013; FERRI et al., 2009). A boa atividade biológica dos flavonóides e não flavonóides dependem muito de sua estabilidade química de isomerização evitando que exista a variação de *trans* a *cis*. Para isso é necessário o controle de certas condições em que estas moléculas devem estar em contato, tais como: as enzimas oxidativas, alta temperatura, pH, umidade, presença de luz e oxigênio (GATTO et al., 2008; VITRAC et al., 2005; SILVA et al., 2011).

A encápsulação desses compostos é uma das formas de manter a estabilidade das moléculas fenólicas dos resíduos da vinificação. Neste contexto, a encapsulação é um processo alternativo para aumentar a estabilidade dos compostos ou moléculas susceptíveis, protegendo das condições ambientais adversas (POURASHOURI et al., 2014).

O encapsulamento é definido como um processo no qual uma molécula ativa está presa ou revestida por uma matriz, que isola a molécula do ambiente, até que ela seja liberada e os materiais que formam essa matriz também são conhecidos como transportadores ou agentes de encapsulação e podem ser de origem natural, sintética ou semi-sintética (AZEREDO, 2005; PORRARUD; PRANEE, 2010; DE BARROS FERNANDES et al., 2014). Embora possam ser utilizados vários tipos de agentes encapsulantes, escolher o mais adequado depende de muitos fatores; o ideal deve ter propriedades de formação de película, ser emulsificante, biodegradável, resistente aos fluidos do trato gastrointestinal, com uma baixa viscosidade, ter conteúdo de sólidos elevados, não ser reativo com o material a ser encapsulado, além de apresentar uma baixa higroscopicidade, proporcionar a liberação do composto encapsulado e ser econômico (BARROS; STRINGHETA, 2006; BHUSARI; MUZAFFAR; KUMAR, 2014; AGHBASHLO et al., 2013; SCHROOYEN; VAN DER MEER; DE KRUIF, 2001; FANG; BHANDARI, 2011; MATALANIS; JONES; MCCLEMENTS, 2011). Os polímeros de maltodextrinas $[(C_6H_{12}O_5)_n \cdot H_2O]$ com graus de equivalência de dextrose (DE) entre 10 e 20 são amplamente utilizados no encapsulamento de ácidos fenólicos, devido a garantir maior estabilidade física a matriz da partícula (BAKOWSKA-BARCZAK; KOLODZIEJCZYK, 2011; ERSUS; YURDAGEL, 2007; TONON; BRABET; HUBINGER, 2010). Outro exemplo o polímero de goma arábica é um heteropolissacarídeo de alta massa molecular formada por uma cadeia lineal de moléculas de D-galactosa unidas por enlaces β -1,4 e β -1,6, que apresenta caráter anfifílico que permite atuar como agente formador de cápsulas (AHMED; RAMASWAMY; NGADI, 2005).

A diferença entre microencapsulação e nanoencapsulação está no tamanho das partículas formadas, os métodos de microencapsulação são caracterizados pela obtenção de partículas com tamanho micrométrico (1-1000 μ m) e de nanoencapsulação (1-1000 nm) (SINGH et al., 2014; RATHORE et al., 2013; SOUZA et al., 2014). Este procedimento foi utilizado com sucesso pelas indústrias de cosméticos, farmacêuticas e alimentares (SOARES et al., 2014). Especificamente, a indústria de alimentos utiliza estas técnicas para preservar e entregar substâncias sensíveis, como gorduras e óleos, compostos aromáticos, fenólicos e antioxidantes, alcaloides, proteínas, peptídeos, vitaminas, minerais, corantes e enzimas (CHEN et al., 2013a; FANG; BHANDARI, 2011; ROCHA; FÁVARO-TRINDADE; GROSSO, 2012). As micro-nanopartículas podem ser realizada por diferentes técnicas, como spray-dryer, spray cooling, coacervação, extrusão, recobrimento em leite fluidizado, lipossomas, complexação por inclusão e por liofilização. As técnicas de encapsulação utilizadas na presente pesquisa foram a atomização, liofilização e emulsificação por baixa

energia (SCHMITZ-SCHUG; KULOZIK; FOERST, 2016; JYOTHI et al., 2010; ESTEVINHO et al., 2013; SHOFINITA; LANGRISH, 2014; PHISUT, 2012).

A nanoencapsulação por liofilização destaca-se entre as demais pela aplicação de baixas temperaturas, o que propicia a preservação da partícula. Esta técnica é baseada na desidratação de um produto congelado por sublimação, sendo realizado primeiramente um congelamento rápido do produto seguido da sublimação do gelo sob vácuo (DUTRA et al., 2016; AZEREDO, 2005). Para a técnica de emulsificação usando baixa energia, uma emulsão consiste em pelo menos dois líquidos imiscíveis (fase oleosa e fase aquosa), sendo um dos líquidos dispersos como pequenas gotículas na outra. As emulsões podem ser classificadas de acordo com a organização espacial de suas fases como óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O). Além disso, existem emulsões simples de O/A ou A/O e emulsões de fase múltipla, como O/A/O ou A/O/A, que também podem ser produzidas. A fase dispersa geralmente consiste no composto bioativo a ser encápsulado na fase oleosa enquanto isso a dispersão aquosa atua como a fase contínua (RODRÍGUEZ et al., 2016).

A digestão gastrointestinal humana é um processo complexo em que ocorre simultaneamente com as transformações mecânicas que reduzem o tamanho das partículas de alimentos e transformações enzimáticas onde macromoléculas são hidrolisadas em constituintes menores que são absorvidas na corrente sanguínea (GUERRA et al., 2012; PINHEIRO, 2013). Os compostos fenólicos estão formados por moléculas como os flavonóides e estilbenos, que apresentam diferentes atividades biológicas anticancerígenas, antioxidantes e de longevidade, os testes biológicos em organismos modelos permitem demonstrar esta atividade. Nos últimos anos, um modelo alternativo e bem caracterizado é utilizado para avaliar o efeito biológico das nanopartículas em organismos vivos para identificar novos alvos farmacológicos. O nematóide *Caenorhabditis elegans* é um organismo bem caracterizado, tendo o genoma completo mapeado com 97 milhões de pares de bases (AVILA et al., 2012). Muitos são os fatores que levam a escolha deste modelo para ensaios biológicos, sendo que 60 a 80% dos genes humanos possuem homólogos no *C. elegans*, ser de fácil cultivo e possuir um tempo de vida de aproximadamente três semanas. Outra vantagem é que, devido a sua pequena dimensão, permite a realização de ensaios em placas de poliestireno e, por ser um nematóide transparente com marcadores fluorescentes, permite que os mecanismos da resposta ao estresse e longevidade sejam facilmente investigados in vivo, se conhece que a longevidade dos organismos vivos por efeito dos fenólicos depende das interações com as proteínas celulares da SIRT1-7 (URANO et al., 2002; GAMI; WOLKOW, 2006; KALETTA; HENGARTNER, 2006).

Desta maneira, nosso trabalho utilizou o nematoide *C. elegans* para a avaliação das nanopartículas de compostos fenólicos dos resíduos da vinificação conferidas na proteção contra os danos causados pelo estresse oxidativo e a sobrevivência dos organismos vivos. O objetivo do presente trabalho foi realizar a nanoencapsulação de extratos fenólicos dos resíduos da vinificação, a avaliação da atividade antioxidante *in-vitro*, da digestão gastrointestinal simulada e do estresse oxidativo e longevidade *in-vivo* em *Caenorhabditis elegans* das nanopartículas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 REAGENTES E MATERIAIS

Todos os reagentes utilizados foram de qualidade P.A. e também água destilada deionizada foi utilizada em todo o processo. Dos agentes encapsulantes, utilizou-se maltodextrina de dextrose equivalente (DE-20) adquiridas do Pryme Foods-Brasil e goma arábica pura (GA) adquiridas do Instantgum BA®, da Colloides Naturels Brasil. Polysorbato 80 (Tween 80) foi adquirido do Sigma-Aldrich-Brasil, Óleo de soja foi adquirido do Jedwards International, Inc. (Braintree MA, Brasil). Alfa amilase, a pepsina e pancreatina foram adquiridas do Sigma-Aldrich-Brasil. As linhagens de *Caenorhabditis elegans* foram cedidas pelo Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande-Brasil.

2.2 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA E DOS EXTRATOS DE COMPOSTOS FENÓLICOS

A matéria prima utilizada neste trabalho foram os resíduos da vinificação de uvas pretas da espécie *Vitis vinifera* L., em suas variedades: Merlot e Shiraz, coletadas em Flores D'Acunha Caixas do Sul no RS-Brasil. As amostras de resíduos foram armazenadas a -18 °C até sua utilização nos experimentos. As amostras foram preparadas da seguinte maneira:

As amostras foram esmagadas manualmente em gral e com pistilo de porcelana, para obter uma massa completamente misturada.

Após a obtenção da massa triturada, separou-se por tratamentos e adicionou-se o solvente para a sua extração fenólica. Empregou-se o método de extração sólido-líquido com metanol a 98% acidificado por HCL a 0,1 M até pH 1,5 para a extrair as moléculas fenólicas, deixando-se em repouso durante 24 horas a temperatura ambiente. Foi

centrifugado a 9000 x g durante 15 minutos em centrífuga (Biosystem-LPW350) o sobrenadante separou-se em recipiente escuro, foi lacrado com folha de alumínio e guardado em refrigeração para posteriores tratamentos.

A evaporação do solvente realizou-se em um rota vapor Fisatom, Modelo 550-Brasil a 70 °C por 3 horas, para concentrar, evaporar todo o solvente metanol e ao final para lavar as moléculas fenólicas coladas no aparelho, adicionou-se água deionizada para misturar todo o extrato, assim obter um extrato aquoso de 3,37% de sólidos totais.

2.3 FORMULAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

2.3.1 Preparação das nanopartículas por secado de atomização e liofilização

Para obter as nanopartículas contendo compostos fenólicos pelo método de secagem por atomização, foi utilizando o extrato aquoso obtido no item 2.2, misturados com biopolímeros de maltodextrina 15,5 DE e goma arábica, como matriz polimérica. As formulações estão descritas na Tabela 1. A encapsulação foi realizada utilizando um *mini* atomizador Labmaq, Modelo PS-1 com as seguintes condições de trabalho:

- Vazão de alimentação: 0,3 L/h
- Vazão de ar comprimido: 40,0 L/min
- Vazão do ar de secagem: 0,85 m³/min
- Temperatura do ar de secagem: 115 °C
- Pressão do ar comprimido: 4,5 bar
- Diâmetro do bico atomizador: 0,5 mm

Para obter os nanopartículas pelo método da liofilização, utilizou-se a mistura do extrato aquoso com maltodextrina 15,5 DE e goma arábica sendo as quantidades descritas na Tabela 1. Inicialmente, foram mantidas em ultra freezer (Indrel, IULT-90-D, Brasil) à temperatura de -80 °C durante 48 horas, e logo liofilizadas por 48 horas, utilizando liofilizador (Liotop, L108, Brasil). Finalmente os produtos foram esmagadas. Imediatamente após obter as nanopartículas em cada método, as mesmas foram colocadas em garrafas escuras, revestidas com papel alumínio e seladas hermeticamente.

O armazenamento das nanopartículas envasadas foi colocado em dessecadores contendo sílica gel à temperatura ambiente (25 ± 2 °C), durante todo o processo da pesquisa.

Tabela 1 - Formulação das nanopartículas contendo extratos fenólicos dos resíduos da vinificação.

NP	Componentes	GA	MD	OS	Tw-80	Tf	ExRu	DA
T ₁	ExS-GA-Atomização (%)	8,3	---	---	---	---	13,7	78
T ₂	ExS-MD- Atomização (%)	---	8,3	---	---	---	13,7	78
T ₃	ExS-GA-Liofilização (%)	8,3	---	---	---	---	13,7	78
T ₄	ExS-MD-Liofilização (%)	---	8,3	---	---	---	13,7	78
T ₅	ExS-GA/MD- Atomização (%)	4,1	4,1	---	---	---	13,7	78,1
T ₆	ExM-GA/MD-Atomização (%)	4,1	4,1	---	---	---	13,7	78,1
T ₇	ExS-Be-Nanocápsula (%)	---	13,3	6,7	6,7	53,3	20	---
T ₈	ExM-Be-Nanocápsula (%)	---	13,3	6,7	6,7	53,3	20	---
T ₉	ExM-MD- Atomização (%)	---	8,3	---	---	---	13,7	78
T ₁₀	ExM-GA- Atomização (%)	8,3	---	---	---	---	13,7	78
T ₁₁	ExM-GA-Liofilização (%)	8,3	---	---	---	---	13,7	78
T ₁₂	ExM-MD-Liofilização (%)	---	8,3	---	---	---	13,7	78
T ₁₃	ExM-GA/MD-Liofilização (%)	4,1	4,1	---	---	---	13,7	78,1

Ti: Tratamentos, GA: Goma Arábica, MD; Maltodextrina, OS: Oleo de Soja, Tw-80: Tween 80, Tf: Tampão fosfato, ExRu: Extrato de resíduos da vinificação, DA: Água Desionizada, ExS: Extrato de Shiraz, ExM: Extrato de Merlot, Be: Baixa energia, NP: Nanopartículas.

2.3.2 Preparação de nanocápsulas por emulsão de baixa energia

As emulsões fabricadas por emulsificação espontânea foram preparadas em base ao método descrito por Davidov-Pardo e McClements (2015), com algumas modificações. Resumidamente, o óleo de soja foi misturado durante 1 h e depois se adicionou o agente tensoativo (Tween 80) e o sistema foi misturado com agitador magnético durante uma hora. À fase orgânica resultante foi adicionado uma fase aquosa (solução 5 mM de tampão de fosfato até pH 7) durante um período de 10 min em agitação constante (700 x g) sob agitador magnético (Fisatom. Modelo 752A-Brasil) a temperatura ambiente. Após a adição da fase orgânica, deixou-se em repouso por 5 minutos, depois adicionou-se o extrato de resíduos da vinificação e em seguida a maltodextrina durante agitação constante a 37 °C/700 x g por 8 horas. A emulsão foi centrifugada a 3000 x g e finalmente foi liofilizada, seguindo a formulação da Tabela 1.

2.4 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO TOTAL DE ANTOCIANINAS, COMPOSTOS FENÓLICOS, FLAVONÓIDES E *TRANS*-RESVERATROL

2.4.1 Determinação de antocianinas totais

O conteúdo de antocianinas foi determinado nas nanopartículas dos resíduos da vinificação pelo método da diferença de pH, em que se dissolve as partículas em dois sistemas-tampão: cloreto de potássio pH 1,0 (0,025 M) e acetato de sódio pH 4,5 (0,4 M), a leitura da absorbância foi realizada a 510 nm, considerando a absorbância máxima para cianidina-3-glicosídeo, e 700 nm para descontar a turbidez da amostra (GIUSTI-WROSLTAD, 2001).

O teor de Antocianinas foi calculado a partir da seguinte Equação:

$$\text{Teor de Antocianinas } \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}}\right) = A \times MM \times FD \times 10^3 / (\epsilon \times l) \quad (1)$$

$$A = [(A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}1,0} - (A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}4,5}] \quad (2)$$

Onde: A_{510} = Absorbância das amostras lidas a 510 nm

A_{700} = Absorbância das amostras lidas a 700 nm

MM = Massa molecular da cianidina 3-glicosídeo 449,2 (g/mol)

FD = Fator de diluição, l = Espessura da cubeta (cm)

ϵ = Absortividade molar (26900), que corresponde à cianidina 3-glicosídeo.

2.4.2 Determinação de compostos fenólicos totais

Foi realizado conforme o método de Folin-Ciocalteu, que consistiu em utilizar 0,5 g das nanopartículas dos resíduos da vinificação em 20 mL de metanol, após realizou-se uma centrifugação de 5000 x g por 30 minutos. Em seguida separou-se do sobrenadante 0,5 mL desse extrato em um tubo de ensaio, ao qual foi adicionado 8 mL de água destilada e 0,5 mL de solução de Folin-Ciocalteu (0,25 M) deixou-se em repouso por 3 minutos, logo adicionou-se 1 mL de solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) 1 M, deixando repousar por 10 minutos. O tubo foi centrifugado (9000 x g por 30 minutos) (Biosystem-LPW350) e mantido na escuridade por duas horas, realizando-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 750 nm sobre cubetas de vidro, tendo como branco o metanol e todos os reagentes sem a alíquota da amostra centrifugada. O teor de fenóis totais (FT) foi determinado por

interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico e expressos como mg de EAG (equivalentes de ácido gálico)/100 g de resíduo seco. Todas as análises foram realizadas em triplicata (BUCIC-KOJIC et al., 2007). A construção da curva de calibração foi preparada com 0, 2, 4, 8, 15 e 20 μL de solução estoque. A equação da linearidade dos fenólicos totais foi $Y = 4,8144X + 0,00003$, onde X corresponde à concentração de fenólicos totais, Y é a absorbância a 750 nm e $R = 0,998$.

2.4.3 Determinação de flavonóides totais

Foi determinada por ensaio colorimétrico usando cloreto de alumínio como agente cromofórico, de acordo com a metodologia descrita por Yang, Martinson e Liu (2009). Misturou-se 0,5 g das nanopartículas dos resíduos da vinificação em 20 mL de metanol por 2 horas, após centrifugou-se a 5000 x g durante 30 minutos. Aliquotas de 250 μL de cada sobrenadante foram misturadas com 1,25 mL de água deionizada. Em seguida acrescentou-se 75 μL de solução aquosa de nitrito de sódio (NaNO_2) a 5% e agitados em vórtex (Warmnest, VX-38-Brasil). Após 5 min, 150 μL de solução aquosa de cloreto de alumínio (AlCl_3) a 10% foram adicionados e as soluções homogeneizadas. Após 6 min, 0,5 mL de solução aquosa de NaOH a 1,0 M foram adicionados e o volume completado para 3,0 mL com água deionizada. As soluções foram agitadas e as absorbâncias medidas a 510 nm, tendo como branco o metanol e para a construção da curva de calibração foi preparada solução estoque e diluições de 0, 20, 40, 80, 100 e 175 μL . A equação obtida foi $Y = 9,3799X + 0,0062$, onde X corresponde à concentração de flavonoides totais, Y é a absorbância e $R = 0,9998$. Os resultados foram expressos como mg de EQ (equivalente de quercetina)/100 g de extrato seco.

2.4.4 Análises do *trans*-resveratrol por cromatografia líquida de alta resolução

Para o análise do *trans*-resveratrol, 0,5 g da amostra foram misturadas com 20 mL de metanol, depois de 2 horas foram centrifugados a 9000 x g por 30 minutos, filtradas em filtro Millipore de 0,22 μM , com auxílio de uma seringa, além disso utilizou-se a ultrafiltração com membranas de 10 kD (Advantec MFS, modelo UHP76) para eliminar os interferentes. O procedimento foi seguido por Cromatografia líquida de alta performance conforme a metodologia descrito por Romero-Perez et al. (2001). O cromatógrafo utilizado teve uma configuração composto por uma bomba de tipo LC-10ATvp, detector de arranjo de fotodiodos (SOD-M10A VP) e injetor automático, todos da marca Shimadzu. As filtrações da

fase móvel foram realizadas com membranas filtrantes de 0,45 µm de diâmetro de poro (Milipore) com sistema de filtração ao vácuo e a degaseificação foi utilizando Ultrassom (Unique, USC-800) por 30 minutos para a retirada as bolhas de ar dissolvidas nos eluentes.

Fases Móveis (Eluentes)

Eluente A: Agua Milli-Q

Eluente B: Metanol

Descrição do Método Condições operacionais utilizadas no HPLC:

Coluna C₁₈, fase reversa (modelo CLC-ODS-M), Shim-pack 250mm x 4,6mm x 5µm mantida a 30 °C; Detetor: 308 nm; Fluxo de 0,5 mL/min; Volume injetado: 20 µL; Gradiente linear de eluição: Concentração de solvente A e B, (50:50); tempo de corrida 10 minutos.

Para esta quantificação utilizou-se o área do pico no comprimento de onda definido para o resveratrol (308 nm), onde definiram-se as respectivas retas de calibração.

Para a construção da curva de calibração, usou-se uma solução padrão estoque de *trans*-resveratrol com uma concentração de 3,88 mg/L, foi preparada em metanol grau HPLC e as soluções de diversas concentrações foram preparadas pela diluição da solução estoque em metanol. A linearidade do *trans*-resveratrol foi construída com injeção, em triplicata, de sete concentrações crescentes de soluções padrão (0,08; 0,39; 0,97; 1,56; 2,14; 2,92; 3,50 mg/L), a curva de calibração obtida foi $Y=2e+06X - 13957$ e R de 0,999

2.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE “*In-vitro*”

2.5.1 Determinação da atividade antioxidante – Método DPPH

Foi realizada conforme o método do radical DPPH descrito por Nenadis et al. (2004). Consistiu em pesar, 0,5 g das nanopartículas dos resíduos da vinificação em 20 mL de metanol por 2 horas, após realizou-se uma centrifugação de 5000 xg (Biosystem-LPW350) durante 25 minutos. Em seguida separou-se o sobrenadante tomando-se 150 µL desse extrato em tubo de ensaio, ao qual foi adicionado 2,85 mL de solução diluída de DPPH e manteve-se em agitação por 15 minutos na ausência da luz. A absorbância foi medida em espectrofotômetro (Kasuki modelo 10UV) a 515 nm, utilizando-se cubetas de vidro. A atividade antioxidante foi determinada com a interpolação da absorbância das amostras contra uma curva padrão construída com Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) e os resultados foram expressos em atividade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC) (mg TEAC por 100 g de resíduo seco). Todas as análises foram realizadas em

triplicata. Para a construção da curva de calibração foi preparado 2000 $\mu\text{M/mL}$ de solução estoque de Trolox e diluições de 80, 160, 240, 320, 405 e 625 μM . A equação da linearidade foi $Y = 0,0012X + 0,0001$, onde X corresponde à concentração de μM (micro molar) de Trolox, Y é a absorbância medida a 515 nm e o coeficiente de correlação foi de $R = 0,999$.

2.5.2 Determinação da atividade antioxidante – Método ABTS

Utilizou-se o método de Surveswaran et al. (2007), o radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$ é formado por uma reação química com 5 mL de solução de persulfato de potássio e 88 μL de uma solução de estoque de ABTS (192 mg de reagente ABTS em 50 mL de água destilada). Uma vez formado o radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$, o mesmo foi diluído em etanol até obter-se uma medida de absorbância de 0,70 ($\pm 0,02$) a 734 nm, a temperatura de 30 $^{\circ}\text{C}$. A absorbância foi medida em espectrofotômetro modelo (Kasuki 10UV), nos tempos 1, 4 e 7 minutos após a adição do extrato da nanopartícula. O teor foi determinado por interpolação na curva padrão construída com Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) antioxidante sintético similar à vitamina E, os resultados foram expressos em atividade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC) (mg TEAC/100 g de extrato seco). Para a construção da curva de calibração foi preparada uma solução estoque de 2 mM/mL e em diluições de 0, 100, 500, 1000, 1500 e 2000 μM . A Equação de linearidade foi $Y = 0,0003X + 0,0053$, onde X é a concentração de μM (micro molar) de Trolox, Y é a absorbância medida a 734 nm e $R = 0,997$.

2.5.3 Determinação da atividade antioxidante - Método do poder redutor

O poder dos extratos de reduzir o íon Fe^{3+} para Fe^{2+} foi determinado pelo método de You-Tung et al. (2015). Um volume de 2 mL de amostra (5 mg de nanopartícula/mL de metanol) foi adicionado em 2 mL de tampão fosfato 0,2 M (pH 6,6) e 2 mL de ferricianeto de potássio (1%). A mistura foi incubada a 50 $^{\circ}\text{C}$ por 20 minutos e adicionou-se na reação 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10%. Uma alíquota de 2 mL foi misturada com 2 mL de água destilada e 0,4 mL de cloreto férrico 0,1% em tubos de ensaio. Após 10 minutos de reação a absorbância da solução resultante foi lida a 700 nm em espectrofotômetro (Kasuki modelo 10UV). O aumento de absorbância na reação indica aumento do poder redutor. As amostras foram preparadas em triplicata e em ambiente escuro.

2.6 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

2.6.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise da superfície das nanopartículas foi realizada no Centro de Microscopia Eletrônica do Sul (CEMESUL), da Universidade Federal do Rio Grande, em microscópio eletrônico de varredura (Jeol, JSM - 6610LV, Tóquio, Japão). As amostras foram depositadas em suportes de alumínio (stubs) revestidos com uma fita condutora de carbono. Em seguida, foram recobertos com uma fina camada de ouro (Desk, Denton Vacuum, Estados Unidos) durante 120 s. A morfologia das amostras foi observada em 1000X de ampliação e utilizada uma aceleração de elétrons de 15 Kv (MACHADO et al., 2014).

2.6.2 Tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta

O tamanho de partícula, índice de polidispersão (PDI) e Potencial Zeta foram determinados por espalhamento de luz dinâmico utilizando-se o equipamento Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments, Worcestershire, RU). O preparo das amostras foi igual para todas as medições, sendo que as suspensões dos encapsulados foram diluídas na proporção de 1:100 em água Milli-Q. Para potencial zeta as amostras foram colocadas na célula de vidro, onde foi estabelecido um potencial de ± 150 mV. Os análises foram realizadas em triplicata, sendo calculada a média e o desvio-padrão (MACHADO et al., 2014).

2.6.3 Umidade.

O teor de umidade das nanopartículas foi determinado gravimetricamente por secagem em estufa (Thelco Model 28, Precision Scientific, Chicago, Ill., U.S.A.) a 105 °C até atingir um peso constante de acordo com AOAC (2000).

2.6.4 Atividade de água

A atividade da água foi determinada por um analisador do Aqua Lab (dispositivos Decagon, Pullman, Wash., U.S.A.) de acordo com AOAC (2000).

2.6.5 Higroscopicidade

A análise de higroscopicidade foi determinada por meio da pesagem de 1,0 g de nanopartícula posteriormente espalhado uniformemente sobre uma placa de Petri colocada em dessecador por 90 min, segundo Goula e Adamopoulos (2008), sob condições de 24 °C e 75% de umidade relativa utilizando solução saturada de NaCl e calculada por meio da Equação 1

$$H = \frac{X}{U \cdot a} \cdot 100 \quad (1)$$

Onde, H = higroscopicidade (%); X = massa de água absorvida (g); U = umidade do pó em base seca (g/g); a = massa da amostra (g).

2.6.6 Solubilidade

A solubilidade foi determinada de acordo com Cano-Chauca et al. (2005) com algumas modificações. Em primeiro lugar, transferiu-se 100 mL de água destilada para um copo e adicionou-se 1,0 g de nanopartícula e agitou-se com um agitador magnético (VMS-C7-2, VWR, Staufen, Alemanha) a 280 x g durante 30 min e depois centrifugadas durante 5 min a 3000 × g. O sobrenadante foi cuidadosamente colhido e seco na estufa a 105 °C. A solubilidade foi calculada como a percentagem de sobrenadante seco em relação à quantidade original de amostra.

2.6.7 Grau de aglomeração

O grau de aglomeração foi avaliado baseando-se no método utilizado por Nijdam e Langrish (2006) com algumas modificações. A nanopartícula, acondicionada de acordo com a metodologia do teste de higroscopicidade, foi levada à estufa a uma temperatura de 102 °C por um período de 1 h. Após foi resfriada em dessecador, uma porção de aproximadamente 1,5 g de amostra foi pesada e rapidamente transferida para peneira de aço inoxidável (peneira Tyler número 32) de 500 µm de 20,5 cm de diâmetro, a qual foi submetida à vibração. O pó que atravessou a peneira foi pesado e o índice de aglomeração determinado pela Equação 2.

$$Ag = \left(\frac{Mt - Mf}{Mt} \right) * 100 \quad (2)$$

Onde Mt é a massa total de amostra; Mf é a massa de finos que atravessam a peneira

2.6.8 Molhabilidade

O teste de molhabilidade foi baseado na metodologia proposta por Sharma, Jana e Chavan (2012) com alguma modificação. O método consiste na queda de 2,0 g de nanopartícula sobre 400 mL de água destilada em temperatura ambiente. A água foi colocada em um béquer de 1000 mL de 12 cm de diâmetro e a nanopartícula foi pulverizada de forma homogênea sobre a superfície do líquido. A contagem de tempo foi interrompida quando toda a superfície da amostra foi molhada. O tempo foi medido com o auxílio de um cronômetro digital. As medições foram realizadas em triplicata.

2.6.9 Temperatura de transição vítrea (Tg) e Análise de calorimetria diferencial de varredura (DSC)

A calorimetria diferencial de varredura e a temperatura de transição vítrea (Tg), das nanopartícula, foi determinada segundo Meng e Ma (2001) em calorímetro diferencial de varredura (Shimadzu, TA-60WS, Quioto, Japão) com modificações. Aproximadamente 2 mg das nanopartícula foram pesadas em cápsulas de alumínio hermético. As cápsulas foram hermeticamente seladas e a varredura foi realizada com uma taxa de aquecimento de 10 °C/min sob uma atmosfera de nitrogênio em um intervalo de temperatura de 30 a 300 °C. Os valores de Tg calcularam se utilizando o software TA Universal Analysis.

2.6.10 Determinação do Cor

A determinação dos parâmetros colorimétricos nas nanocápsulas foi obtida no sistema CIELAB, utilizando colorímetro portátil marca Konica Minolta CR-400, calibrado com placa de porcelana branca, pelo diagrama tridimensional de cores (L-a-b). Onde “L” indica a luminosidade (0 = Black and 100 = White), a* e b* representam coordenadas de cromaticidade (+a* = Vermelho, -a* = Verde, +b* = Amarelo, -b* = Azul). O ângulo Hue foi determinado pela Equação 3 utilizando a relação de 0° ou 360° (Vermelho), 90° (Amarelo), 180° (Verde), 270° (Azul) (GOMEZ-PLAZA, MINANO; LOPEZ-ROCA, 2006).

$$C = (a^2 + b^2)^{1/2}$$

$$Hue = \tan^{-1} (b/a) \quad (3)$$

2.7 RENDIMENTO DA NANOENCAPSULAÇÃO

A eficiência de encapsulamento refere-se ao potencial dos materiais da matriz parede para manter o material do núcleo dentro da nanopartículas. Para avaliar a eficácia da nanoencapsulação se realizou a quantificação dos metabolitos presentes na extração de seus princípios ativos antes e depois da encapsulação. Neste experimento foram determinados de acordo com um método modificado de Mahdavi et al. (2016). Com algumas modificações. Pesaram-se 100 mg de amostras e adicionou-se cerca de 1 mL de água destilada e, em seguida, as amostras foram misturadas num agitador magnético por 15 minutos até a solubilidade completa das partículas. Em seguida, foram centrifugadas por 10 minutos a 2000 x g. O sobrenadante foi utilizado para os análises e o rendimento da encapsulação, foi calculada através da equação 4.

$$\text{Rendimento de encapsulação (\%)} = (C_s/C_t) \cdot 100 \quad (4)$$

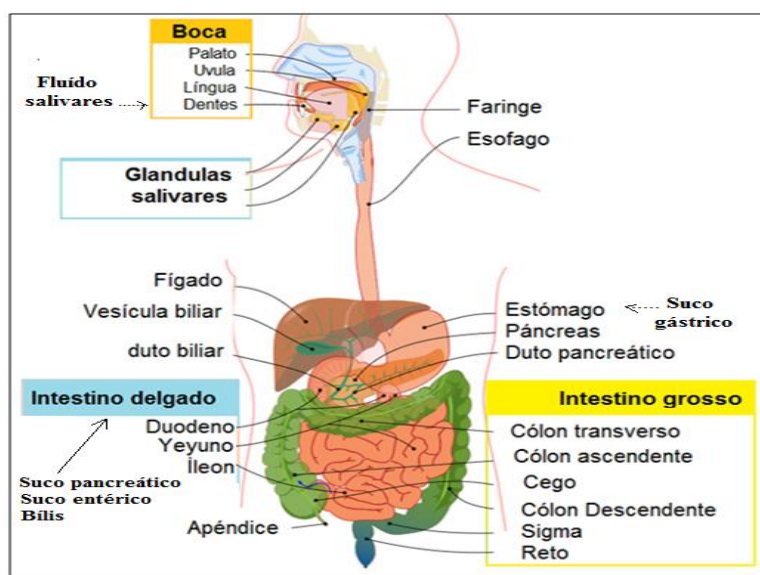
Onde: C_s = Componentes totais após da ruptura das nanopartículas e sua quantificação de uma quantidade conhecida; C_t = Componentes da superfície a quantidade de compostos contidos antes da encapsulação.

2.8 DIGESTÃO GASTRO-INTESTINAL *IN-VITRO*

A digestão *in vitro* foi realizada simulando partes do aparato digestivo como a boca, estômago, intestino delgado e intestino grosso (Figura 1), como descrito por Reis et al. (2008), modificada por Salawu et al. (2017). 2 g de nanoesfera foram pesados e dissolvidos em 40 mL de água destilada. Simulando a boca 300 µL de α -amilase (32,5 mg de α -amilase foi dissolvido em 25 mL de CaCl_2 1 mM a pH 7) foi adicionado aos tubos onde continham as amostras nanoencapsuladas e foram coletadas amostras para sua avaliação fenólica. Simulando o estômago os tubos foram incubados num banho de água com agitação a 37 °C durante 10 min. Após 10 min, o pH foi ajustado para um valor de 2,0 usando HCl concentrado. Após 30 min de incubação em um banho de água com agitação a 37 °C, adicionou-se 2,0 mg de pepsina que foi dissolvida em 1 mL de HCl (0,05 M). Os tubos foram então incubados num banho de água com agitação a 37 °C durante 10 minutos e amostras foram coletadas para sua avaliação fenólica. Simulando o intestino delgado, após mais 20 min

de agitação dos tubos, o pH foi ajustado para 6 usando NaOH (0,5 M). Em seguida, foram adicionados 10 mL de pancreatina (3 g de pancreatina em 20 mL de água destilada) e os tubos foram incubados num banho de água com agitação a 37 °C durante 20 minutos. Amostras foram coletadas para sua avaliação fenólica. Finalmente o pH foi ajustado para 7,5 utilizando NaOH 0,5 M, simulando condições de pH no intestino grosso. Em seguida, os tubos foram incubados durante 10 min num banho de água com agitação a 37 °C em uma incubadora Shaker de bancada (Marca, Cientec-CT. Modelo-712RNT). A amostra digerida foi incubada a 100 °C durante 4 minutos para inativar as enzimas e a amostra digerida foi então centrifugada (Hanil, Supra 22 K, modelo 1544-6906, Coréia do Sul) durante 60 minutos a 3,200 x g e, em seguida, a fração solúvel foi mantida na geladeira para análises de fenólicos, flavonóides, antioxidantes e *trans*-reveratrol. A fração insolúvel foi descartada.

Figura 1 - Modelo biológico do sistema gastrointestinal em seres humanos



2.9 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO E LONGEVIDADE *IN-VIVO* COM *CAENORHABDITIS ELEGANS*

2.9.1 Cepas do modelo *in vivo* *C. elegans*, cultivo e sincronização

As cepas de *C. elegans* de tipo selvagem utilizadas neste estudo foram obtidas do Instituto de Ciências Biológicas-CIB e os testes foram desenvolvidos no laboratório de Bioquímica Animal Funcional de Organismos Aquáticos (BIFOA)-CIB-FURG (Universidade

Federal do Rio Grande-Brasil). Realizou-se transferindo animais L₁ (nematóide entre 8-12 horas de vida) para uma solução 1:1 de tampão M9 (22 mM KH₂PO₄; 42 mM Na₂HPO₄; 85,5 mM NaCl; 1 mM MgSO₄) e solução de congelamento (50 mM Tampão Fosfato; 100 mM NaCl; 30% de glicerina). Desta mistura 1 mL foi colocado em tubos de 1,5 mL e armazenadas em congelamento no ultra freezer (- 80 °C) até a sua utilização. As linhagens utilizadas foram propagadas a 20 °C em placas de meio de crescimento de nematóides (NGM- Nematode Growth Medium) (Brenner, 1974) semeados com *E. coli* OP50 como alimento e incubadas a 20 °C, o que permitiu o desenvolvimento do ciclo de vida normal. A manutenção das linhagens foi feita transferindo animais em diferentes estágios de vida para novas placas à medida que a camada de bactéria ficava escassa. A sincronização das cepas foi conseguida através de lise alcalina (ovoposição), que se baseia no tratamento de lavagem dos nematóides adultos grávidos com uma solução (NaOH a 1%, NaOH 0,25 M) das placas aos tubos de centrifuga, seguido de flocos numa solução de sacarose a 30% (m/v) para separar os ovos de vermes dissolvidos e detritos bacterianos. Os ovos foram lavados com tampão M9 (KH₂PO₄ 0,02 M, Na₂HPO₄ 0,04 M, NaCl 0,08 M e 0,001 M MgSO₄) e deixaram-se chocando durante a noite em placas de agar NGM sem *E. coli*. Os animais L₁ foram então transferidos para placas NGM semeadas com *E. coli* OP50 contendo ou não um volume de 10 uL das nanoesferas (T₂ e T₉), das concentrações de 50, 100 e 150 mg/ml, por 36 h a 20 °C. A ovoposição consiste em colocar hermafroditas grávidos nas placas de NGM e deixados por 6 a 8 horas. Após esse tempo, os animais foram retirados deixando somente os ovos colocados por estes animais (AVILA et al., 2012)

2.9.2 Tempo de vida dos *C. elegans*

Os nematóides jovens sincronizadas com idade L₁ (entre 8-12 horas) foram transferidas para placas de agar NGM (Medio de crecimiento de nematóides) frescas (diâmetros de 96 mm) contendo cada um 10 uL das nanoesferas ensaiadas e crescidas a 20 °C. Quando os nematóides atingiram o estágio L₄ (2,5 a 3 dias depois), eles foram transferidos com um fio de platina para pequenas placas de agar NGM frescas (diâmetros de 35 mm). Quinze animais foram transferidos por placa e utilizaram-se 100 nemátodos pelo menos por tratamento. Os vermes foram transferidos num meio de crescimento de nemátodos com *E. coli* OP50 como recursos alimentares diariamente durante 6 dias consecutivos até a cessação do oitavo dia para evitar gerações sobrepostas. Depois, os vermes foram transferidos em placas NMG a cada

dois dias. Os nematóides foram marcados como morto se eles não responderam ao estímulo táctil com o fio de platina, os testes foram feitas em triplicado (CHARÃO et al., 2015).

2.9.3 Estresse oxidativo em *C. elegans*

Para a medição das espécies reativas de oxigênio (ROS), 1000 nematóides de cada grupo e grupo controle foram tratados seguindo o protocolo de tempo de vida. Após do tratamento de tempo de vida, os nematóides foram ressuspensos em 100 µL de solução de NaCl 0,9% (m/v) e transferidos para uma placa de 96 poços. Em seguida, adicionou-se 100 µL de diacetato de 2,7-diclorofloresceína 0,05 mM (DCF-DA; Sigma-Aldrich Co.) e a fluorescência foi medida por 5, 30, 60, 90 e 120 minutos a uma excitação de 485 nm e emissão de 530 nm utilizando um leitor de microplacas (Spectramax Me2; Molecular Devices LLC, Sunnyvale, CA, EUA). Na presença de espécies reativas, a DCF-DA é oxidada ao produto fluorescente diclorofloresceína (DCF). Os valores foram expressos como unidade arbitraria da intensidade de fluorescência em relação ao controle (CHARÃO et al., 2015).

2.9.4 Longevidade em *C. elegans*

A linhagem selvagem de tipo N2 foi utilizada para os ensaios relativos a longevidade. Os nematóides sincronizados no estágio L1 em meio (10 a 15 nematóides por 20 µL) contendo 5 mg/mL de *E. coli* OP50, receberam uma mistura de penicilina-estreptomicina a uma concentração 1% (v/v). Logo de 120 mL de suspensão de nematóides, 1.26 mL foram transferidos para cada poço de uma microplaca de 96 poços, colocada sobre agitador de placas de microtitulador durante 2 min e incubadas durante 45 h a 20 °C, até que os animais atingirem o estágio L4 (adultos). Passado esse período foi adicionado 30 µL de uma solução estoque de 0,6 mM de Fluorodisoxiuridina (FUDR) a cada poço para esterilizar os animais. Após 8-12 h da adição de FUDR foi adicionado 1% que corresponde a um volume de 7,5 µL das nanoesferas de T₂ e T₉ de concentrações iniciais de 50, 100 e 150 mg/mL, e selados com filme plástico (Press'n'Seal, Glad Okland, CA) e incubou-se a 20 °C. 5 µL de *E. coli* OP50 (100 mg/mL) foram adicionados a cada poço para alimentar os nematóides. Foi observado cada dia o comportamento dos nematóides vivos e mortos (que apresentassem natação morfológica característica) ao microscópio, para determinar as taxas de sobrevivência. Os dados foram submetidos ao programa estatístico GraphPad Prisma versão

5 para construção dos gráficos de sobrevivência e cálculo de valores $p < 0,0001$ (Log-Rank) (SOLIS; PETRASCHECK, 2011).

2.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados foi realizada pela aplicação da Anova e o teste de Tukey visando identificar diferenças significativas entre as médias, usando o software Statistica® 5,0. O nível de significância considerado para a diferença entre as médias foi de 5 % ($p < 0,05$). Todas as análises químicas foram realizadas em triplicata e os resultados apresentados como média $\pm$ desvio padrão. As curvas de longevidade dos *C. elegans* foram estimadas pela análise de sobrevivência de Kaplan-Meier e o teste Log-Rank, para comparação utilizou o software GraphPad Prism (GraphPad Prism, Inc., La Jolla, CA, EUA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO TOTAL DE ANTOCIANINAS, FENÓLICOS E FLAVONÓIDES

Na Tabela 2 se apresenta o conteúdo de antocianinas, fenólicos totais e flavonóides totais das nanopartículas dos extratos de resíduos de vinificação. Os teores de antocianinas totais das nanopartículas foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) entre todos os tratamentos formulados, sendo T₉ (extrato de Merlot encapsulado com goma arábica e elaborado por atomização) o que teve a maior quantidade de antocianinas em comparação com os demais tratamentos, obtendo um valor de 402,94 mg malvidin-3-glicosídeo/100 g de extrato (b.s.). A comparação entre os tratamentos em função das antocianinas mostraram diferenças em sua característica física, por apresentar uma maior tonalidade de cor vermelha escura na encapsulação. Os resultados comparadas com outras pesquisas, mostram que o valor de antocianinas dos tratamentos T₂, T₆, T₈, T₁₀ e T₁₁ foram superiores ao obtido por Rocha-Parra et al. (2016), em seu estudo sobre microencapsulados de vinho vermelho (100 mg de malvidin-3-g/100 g de polvo). Estes resultados foram inferiores aos reportados por Souza et al. (2015), que obtiveram valores em microencapsulados de resíduos de uva Bordo, que estiveram entre 610 e 1930 mg de malvidin-3-glicosídeo/100 g de matéria seca, respectivamente), esta diferença é possivelmente devido ao tipo de variedade, clima e solo do origem das uvas.

Tabela 2 - Composição de antocianinas, fenólicos e flavonóides totais apresentada pelas nanopartículas dos extratos de resíduos da vinificação

Ensaio de NP	Antocianinas totais (mg mvd-3-glu/100 g b.s.)	Ensaio de NP	Fenólicos totais (mg GAE/100 g b.s.)	Ensaio de NP	Flavonóides totais (mg QE/100 g b.s.)
T ₁	17,838±0,99 ^h	T ₁	3730,33±0,36 ^{abc}	T ₁	8,38± 1,73 ^{cd}
T ₂	128,13±4,81 ^e	T ₂	4530,86±0,35 ^a	T ₂	29,55±1,30 ^a
T ₃	53,78±2,72 ^f	T ₃	1145,63±0,02 ^c	T ₃	3,76±0,73 ^e
T ₄	57,69±2,74 ^f	T ₄	4320,53±0,30 ^{ab}	T ₄	30,13±1,69 ^a
T ₅	28,57±1,23 ^g	T ₅	1145,86±0,37 ^c	T ₅	3,34±0,22 ^e
T ₆	232,40±4,69 ^b	T ₆	1318,08±0,32 ^{bc}	T ₆	5,73±1,18 ^d
T ₇	11,82±1,93 ^h	T ₇	1504,77±0,44 ^{abc}	T ₇	25,6±0,33 ^b
T ₈	169,99±4,18 ^d	T ₈	1185,14±0,15 ^{bc}	T ₈	7,47±0,97 ^{cd}
T ₉	402,94±3,19 ^a	T ₉	2354,55±0,54 ^{abc}	T ₉	24,78±0,91 ^b
T ₁₀	243,42±4,18 ^b	T ₁₀	946,51±0,05 ^c	T ₁₀	5,39±1,63 ^d
T ₁₁	194,18±2,09 ^c	T ₁₁	1747,24±0,39 ^{abc}	T ₁₁	5,77±0,75 ^d
T ₁₂	38,11±1,23 ^g	T ₁₂	1245,59±0,41 ^{bc}	T ₁₂	13,93±0,97 ^c
T ₁₃	45,68±6,24 ^f	T ₁₃	2061,11±0,43 ^{abc}	T ₁₃	6,25±0,54 ^d

T₁: ExS-GA-Atomização, T₂: ExS-MD- Atomização, T₃: ExS-GA-Liofilização, T₄: ExS-MD-Liofilização, T₅: ExS-GA/MD-Atomização, T₆: ExM-GA/MD-Atomização, T₇: ExS-Be-Nanoemulsão, T₈: ExM-Be-Nanoemulsão, T₉: ExM-GA-Atomização, T₁₀: ExM-MD-Atomização, T₁₁: ExM-GA-Liofilização, T₁₂: ExM-MD-Liofilização, T₁₃: ExM-GA/MD-Liofilização, mvd-3 glu: malvidin-3-glicosídeo, GAE: equivalente ácido gálico, QE: equivalente a quercetina, Letras minúsculas iguais nas colunas indicam que não há diferença estatística, NC: Nanopartículas.

Ao observar os valores de fenólicos totais nas nanopartículas de resíduos da uva procedentes da vinificação, verificou-se que entre alguns dos tratamentos das formulações existiu diferença significativa ($p < 0,05$). Pode se observar que o tratamento T₂ (extrato de Shiraz encapsulado com maltodextrina e elaborado por atomização) apresentou o maior valor de fenólicos totais entre todos (4530,86 mg GAE/100 g base seca), enquanto que o grupo de tratamentos que contém extrato Merlot e emulsões, o tratamento T₉ (extrato de Merlot encapsulado com goma arábica e elaborado com secagem por atomização) foi o que apresentou a maior quantidade de fenólicos totais (2354,55 mg GAE/100 g base seca). Os valores encontrados neste estudo foram superiores aos reportados por Rocha-Parra et al. (2016), em encapsulados por liofilização de vinho vermelho (1593 mg GAE/100 g b.s.). Também determinou-se que foi maior aos reportados por Boonchu e Utama-ang (2015), sobre a microencapsulação de compostos fenólicos de resíduos de uva vermelha, esta diferença

deve-se possivelmente ao tipo de variedade, práticas culturais da procendencia das uvas e métodos de extração de fenólicos.

No conteúdo de flavonóides totais das nanopartículas de resíduos da uva procedentes da vinificação, observou-se que entre alguns tratamentos das formulações existiu diferença significativa ($p < 0,05$). Ademais pode se observar que os tratamentos T₂, T₄ e T₇, de encapsulação contendo extratos de Shiraz foram os que apresentaram a maior quantidade de flavonóides totais neste grupo (30,113, 29,55 e 25,6 mg Quercetina/100 g base seca), respectivamente. Dos encapsulados que contiveram extratos de Merlot o T₉ foi o que apresentou maior quantidade de flavonóides totais (24,78 mg Quercetina/100 g b.s.). Os valores encontrados neste estudo foram menores aos obtidos por Souza et al. (2014), quando avaliaram extrato microencapsulado de bagaço da vinificação da uva e encontraram teor de flavonóides totais entre 1,14 a 36,80 mg de quercetina/g de matéria seca. A variabilidade dos valores comparadas entre os tratamentos, deveu-se à influência de vários factores como tipos de extratos utilizados e biomassa durante a formulação das nanopartículas, referente a estes chegou-se a determinar que das formulações baseadas, nos extratos Shiraz o T₂ formulada com maltodextrina e processada por atomização foi o melhor tratamento e baseados nos extratos Merlot determinou-se que o T₉ formulado com goma arábica e atomização, foi o que apresentou a maior quantidade de antocianinas, fenólicos e flavonóides totais.

3.2 AVALIAÇÃO *IN-VITRO* DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A Tabela 3 Apresenta os valores de atividade antioxidante das nanopartículas dos extratos de resíduos de vinificação. A análise da atividade antioxidante pelo método DPPH apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos, exceto entre T₁₁ com T₁₂ e T₃ com T₁₀, onde a formulação de T₂ (com extrato Shiraz, maltodextrina e elaborado com secagem por atomização) foi o que teve o valor mais alto de atividade antioxidante (665,55 mg Eq-Trolox/100 g de amostra em base seca), seguido do tratamento T₉ formulado com extrato Merlot, goma arábica e elaborado por atomização (359,16 mg Eq-Trolox/100 g de amostra em base seca). Os valores encontrados neste estudo foram inferiores aos reportados por Kuck et al. (2016) sobre a microencapsulação dos fenólicos da casca de uva variedade Bordo que teve valor de 1270,5 mg Eq-Trolox/100 g de amostra seca. Essa diferença pode-se dever ao tipo de variedades da uva, biomassa utilizada na formulação e aos parâmetros de secagem por atomização, onde varia muito o rendimento dos princípios ativos do produto final, porque ficam partículas coladas na câmara de secagem e o vapor de ar

quente que sai durante a secagem, elimina partículas fenólicas provocando uma diminuição de princípios ativos nas nanopartículas obtidas.

Tabela 3 - Atividade antioxidante das nanopartículas dos extratos de resíduos da vinificação.

Ensaio de NP	DPPH (mg TEAC/100 g Amostra) b.s	Ensaio de NP	ABTS (mg TEAC/100 g Amostra) b.s	Ensaio de NP	Poder redutor (Abs)
T ₁	51,62±3,04 ⁱ	T ₁	301,16±5,13 ^d	T ₁	0,616±0,016 ^f
T ₂	665,55±2,96 ^a	T ₂	1850,19±2,12 ^a	T ₂	1,565±0,021 ^b
T ₃	34,20±1,80 ^{jk}	T ₃	135,13±7,56 ⁱ	T ₃	0,355±0,023 ⁱ
T ₄	591,14±3,68 ^b	T ₄	1519,11±6,09 ^a	T ₄	1,944±0,016 ^a
T ₅	220,49±3,25 ^d	T ₅	497,91±2,76 ^c	T ₅	0,768±0,006 ^e
T ₆	27,66±3,11 ^k	T ₆	172,26±5,72 ^g	T ₆	0,439±0,014 ^h
T ₇	149,82±2,82 ^e	T ₇	269,30±1,27 ^e	T ₇	0,382±0,016 ^{hi}
T ₈	72,92±2,58 ^h	T ₈	155,71±5,95 ^h	T ₈	1,515±0,048 ^b
T ₉	359,16±3,37 ^c	T ₉	642,09±3,95 ^b	T ₉	1,038±0,010 ^d
T ₁₀	41,76±1,12 ^j	T ₁₀	300,61±5,85 ^d	T ₁₀	0,209±0,011 ^j
T ₁₁	110,4±1,46 ^g	T ₁₁	244,50±4,47 ^f	T ₁₁	0,536±0,012 ^g
T ₁₂	101,4±0,52 ^g	T ₁₂	186,079±1,27 ^g	T ₁₂	1,475±0,052 ^c
T ₁₃	133,07±2,7 ^f	T ₁₃	309,95±2,74 ^d	T ₁₃	0,738±0,011 ^e

T₁: ExS-GA-Atomização, T₂: ExS-MD- Atomização, T₃: ExS-GA-Liofilização, T₄: ExS-MD-Liofilização, T₅: ExS-GA/MD-Atomização, T₆: ExM-GA/MD-Atomização, T₇: ExS-Be-Nanoemulsão, T₈: ExM-Be-Nanoemulsão, T₉: ExM-GA-Atomização, T₁₀: ExM-MD-Atomização, T₁₁: ExM-GA-Liofilização, T₁₂: ExM-MD-Liofilização, T₁₃: ExM-GA/MD-Liofilização, GA: Goma Arábica, MD; Malto Dextrina, Be: Baja energia, S: Extrato de Shiraz, M: Extrato de Merlot, Letras minúsculas iguais nas colunas indicam que não há diferença estatística, NC: Nanopartícula.

Os valores da atividade antioxidante medida pelo método ABTS apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos de encapsulação, onde o melhor tratamento foi o T₂ com um valor de 1850,19 mg TEAC/100 g de amostra seca, seguido de T₄, as duas representadas pelo extrato de Shiraz. Além disso, em função do extrato de uva Merlot o T₉ foi o que apresentou relativamente o maior valor igual a 642,09 mg TEAC/100 g de amostra seca. Os valores determinados dos tratamentos ótimos foram superiores aos reportados por Stoll et al. (2016), sobre a microencapsulação de fenólicos a partir dos resíduos de uva cabernet sauvignon que apresentaram entre (320-782,5) mg Eq-Trolox/100 g de amostra seca. Esse resultado deve-se ao alto conteúdo de antocianinas e flavonóides, nos tratamentos de encapsulação que contribuíram a alto poder antioxidante. Os valores da atividade antioxidante pelo método do poder redutor das encapsulações apresentaram

diferença estatística entre os tratamentos (Tabela 3), onde os melhores tratamentos (T₂ e T₄) foram os representantes do extrato Shiraz e dos tratamentos T₈, T₉ e T₁₂ foram do extrato Merlot. Os comportamentos redutores destes nanopartículas resultaram ser interessantes por sua alta capacidade de reduzir radicais livres, já que foi uma estimativa da capacidade de um composto em reduzir Fe⁺³ (forma de ferricianeto) para Fe⁺² (forma ferrosa) na presença de um antioxidante através da mudança do cor amarelo da solução para tons verde azul, formando o composto azul da Prússia (Ferreira et al., 2007). Entretanto nossos resultados comparados com os reportados por Baydar et al. (2011), em extratos secos de semente de uvas Cabernet Sauvignon com valor de absorbância (1,68) foram semelhantes a nosso estudo. Comparadas com análises em extratos de casca da mesma variedade com absorbância (0,19), foram inferiores aos nossos resultados.

O fundamento destes conteúdos indica que a semente tem alta capacidade de poder redutor possivelmente devido à presença de outros polifenóis diferentes as antocianinas, porque se sabe que na casca é onde se encontraram as antocianinas, porém estas amostras foram definidas como fontes de alto potencial antioxidante. Considerando esta afirmação, as nanopartículas desenvolvidas neste estudo, os resíduos da vinificação da variedade Shiraz e Merlot, seriam também amostras com alto potencial antioxidante. A variabilidade dos encapsulados sobre os valores da atividade antioxidante pelos métodos de DPPH, ABTS e poder redutor, devem-se principalmente à formulação de cada tratamento diferindo do tipo de extrato de resíduo de uva, material de parede e método de encapsulamento. Além disso, existe diferença de conteúdo de fenólicos entre os dois tipos de extrato como se pode observar na Tabela 2, onde o tratamento T₉ constituído pelo extrato Merlot apresentou maior conteúdo de antocianinas que o tratamento T₂ constituído pelo extrato Shiraz, porém as cápsulas T₂ e T₄, tiveram maior conteúdo de fenólicos e flavonóides totais. Aprofundando esta discussão a variedade Shiraz apresentou maior número e maior tamanho de sementes em sua estrutura que o resíduo Merlot, a justificação é porque os compostos fenólicos se concentram nas sementes da uva que formam parte dos resíduos da vinificação, isso levou a ter uma diferença no conteúdo de antocianinas totais, fenólicos totais, flavonóides totais e atividade antioxidante nas formulações das nanopartículas.

3.3 ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO E POTENCIAL ZETA

Na Tabela 4 se apresenta os valores de diâmetro de partícula, potencial zeta e índice de polidispersão das nanoesferas com o objetivo de avaliar a dispersão da mobilidade

eletroforética. Como resultado na análise da distribuição do tamanho de partículas existiu diferença estatística ($P < 0,05$) entre as formulações, além disso, foram utilizados dois tipos de extratos de resíduos da variedade Shiraz e Merlot, procedentes da vinificação para o encapsulamento. Entretanto as nanoesferas apresentaram diâmetros de partículas compreendidos entre 112,63 e 616,07 nm, de acordo com as formulações de nanoesferas testadas. A nanoesfera formulada com extrato de resíduo Shiraz, polímero de maltodextrina e atomização, foi o que teve o valor menor de tamanho de partículas equivalente a 112,63 nm em comparação aos demais tratamentos com este mesmo resíduo.

Tabela 4 - Tamanho de partículas, índice de polidispersão e potencial zeta das nanopartículas dos extratos de resíduos da vinificação.

Ensaio de nanopartículas		Diâmetro de partículas (nm)	IPD	Pz (mV)
T ₁	ExS-GA-Atomização	515,40±2,12 ^e	0,655±0,20	-17,30±0,31
T ₂	ExS-MD-Atomização	112,63±9,42 ^a	0,464±0,04	-17,36±0,17
T ₃	ExS-GA-Liofilização	545,53±2,14 ^f	0,941±0,15	-3,14±0,46
T ₄	ExS-MD-Liofilização	203,30±4,01 ^{bc}	0,597±0,05	-3,14±0,53
T ₅	ExS-GA/MD-Atomização	187,89±13,27 ^b	0,694±0,18	-17,10±0,75
T ₆	ExM-GA/MD- Atomização	294,60±11,53 ^d	0,77±0,06	-17,90±0,85
T ₇	ExS-Be-Nanocápsula	606,87±5,81 ^h	0,56±0,28	-6,76±0,37
T ₈	ExM-Be-Nanoemulsão	616,07±4,70 ^h	0,68±0,22	-6,65±0,22
T ₉	ExM-MD- Atomização	202,33±10,79 ^{bc}	0,545±0,29	-13,50±1,61
T ₁₀	ExM-GA-Atomização	573,67±3,73 ^g	0,592±0,08	-11,20±0,80
T ₁₁	ExM-GA-Liofilização	555,67±2,18 ^{fg}	0,901±0,14	-7,55±4,21
T ₁₂	ExM-MD-Liofilização	219,97±3,73 ^c	0,57±0,07	-2,80±0,97
T ₁₃	ExM-GA/MD-Liofilização	314,33±11,13 ^d	0,786±0,06	-16,9±0,85

T₁: ExS-GA-Atomização, T₂: ExS-MD- Atomização, T₃: ExS-GA-Liofilização, T₄: ExS-MD-Liofilização, T₅: ExS-GA/MD-Atomização, T₆: ExM-GA/MD-Atomização, T₇: ExS-Be-Nanocápsula, T₈: ExM-Be-Nanoemulsão, T₉: ExM-GA-Atomização, T₁₀: ExM-MD-Atomização, T₁₁: ExM-GA-Liofilização, T₁₂: ExM-MD-Liofilização, T₁₃: ExM-GA/MD-Liofilização, GA: Goma Arábica, MD: Malto Dextrina, ExS: Extrato de Shiraz, ExM: Extrato de Merlot, Be: Baja energia, IPD: Índice de Polidispersão, Pz: Potencial zeta, Letras minúsculas iguais nas colunas indicam que não há diferença estatística,

A nanoesfera formulada com resíduo Merlot, polímero de maltodextrina e secagem por atomização, foi o que teve o menor diâmetro de partícula (202,33 nm) entre os tratamentos deste mesmo resíduo. As cápsulas elaboradas por emulsão espontânea de baixa

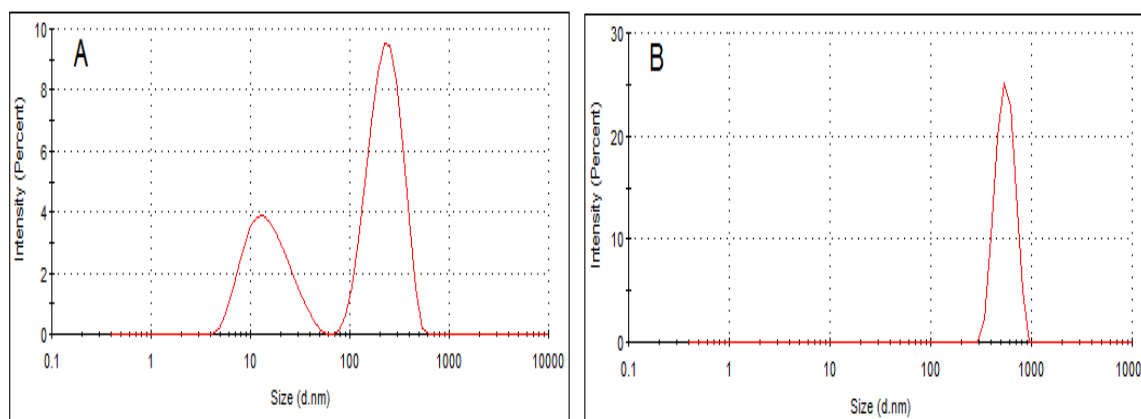
energia com óleo de soja e Tween 80, resultaram ter o tamanho de partículas de 606,87 nm (T₇) e 616,07 nm (T₁₃) maiores que todos os demais tratamentos. Em comparação com o resultado de outras pesquisas determinou-se que o diâmetro das partículas de nossas nanopartículas foram pequenos com a utilização do secagem por atomização e liofilização. Ao respeito Davidov-Pardo, Arozarena e Marín-Arroyo (2013), determinaram um diâmetro médio de 6,7 µm, na microencapsulação com secagem por atomização de extrato de semente de uva. Tonon et al. (2010), obtiveram na encapsulação de açaí diâmetros de 10,08 µm. Ferrari et al.(2012), obtiveram na encápsulação de amora diâmetros entre 12,52 e 34,18 µm. Bastos et al. (2012), usando quitosana em encápsulado de suco de caju, obtiveram partículas entre 0,2-5,0 µm. Carneiro et al. (2013), estudando encapsulados do óleo de linhaça, obtiveram distribuição de tamanho de partículas entre (0,02-160,0 µm). Moser, Souza e Nicoletti (2016), em encapsulados de suco de uva por atomização determinaram um diâmetro de partícula médio de 11,57 µm. Madene et al (2006), nas nanopartículas por liofilização indicaram que os diâmetros das partículas estão geralmente entre 10-150 µm.

No entanto os diâmetros das partículas dos tratamentos por emulsificação de baixa energia estiveram dentro da faixa de 0,2-2500 µm, reportado por Betz e Kulozik (2011), sobre a microencapsulação de antocianinas de mirtilo. Quando foram comparadas com nanopartículas elaboradas com métodos de lipossomas nossas cápsulas resultaram ser de maior tamanho aos reportados por Gibis, Vogta, e Weiss (2012), sobre encápsulado por lipossomas/homogeneização de alta pressão contendo extrato de uva com diâmetros de partículas <100 nm.

Em relação aos resultados do índice de polidispersão (IPD) nas nanopartículas, observa-se que as cápsulas formadas por maltodextrinas (MD) e atomização, apresentam menor IPD que as cápsulas formadas com goma arábica (GA), mistura de GA/MD e atomização. Também foram menores as cápsulas formadas com goma arábica (GA), mistura de GA/MD e liofilização. Por ultimo estas cápsulas T₂ e T₉, tiveram também índices de polidispersão menores que as cápsulas da emulsão espontanea de baixa energia. Estes resultados são importantes por que permitem conhecer a distribuição do tamanho de partículas para determinar com certeza as formulações dos encápsulados em uma etapa de produção, desejando-se que as partículas elaboradas apresentem uma distribuição unimodal, com baixo índice de polidispersão (AVGOUSTAKIS et al., 2002). Em nosso trabalho todas as formulações, apresentaram uma ampla faixa de tamanho de partícula, com uma distribuição bimodal, os resultados destas formulações podem-se considerar como satisfatórios em especial as cápsulas T₂ e T₉, pois as réplicas em triplicata foram reprodutíveis. Entretanto os

índices de polidispersão dos tratamentos elaborados com liofilização e emulsão foram superiores aos encapsulados elaborados com secagem por atomização. Nesse sentido apresentamos o comportamento do índice de polidispersão das melhores formulações T₂ (extrato de Shiraz, maltodextrina e atomização) e T₉ (extrato de Merlot, maltodextrina e atomização), onde seu IPD foram de 0,464 e 0,54 (Figura 2).

Figura 2 - Índice de polidispersão das nanoesferas. A) Extrato Shiraz, maltodextrina e atomização (T₂) e B) Extrato Merlot, maltodextrina e atomização (T₉).

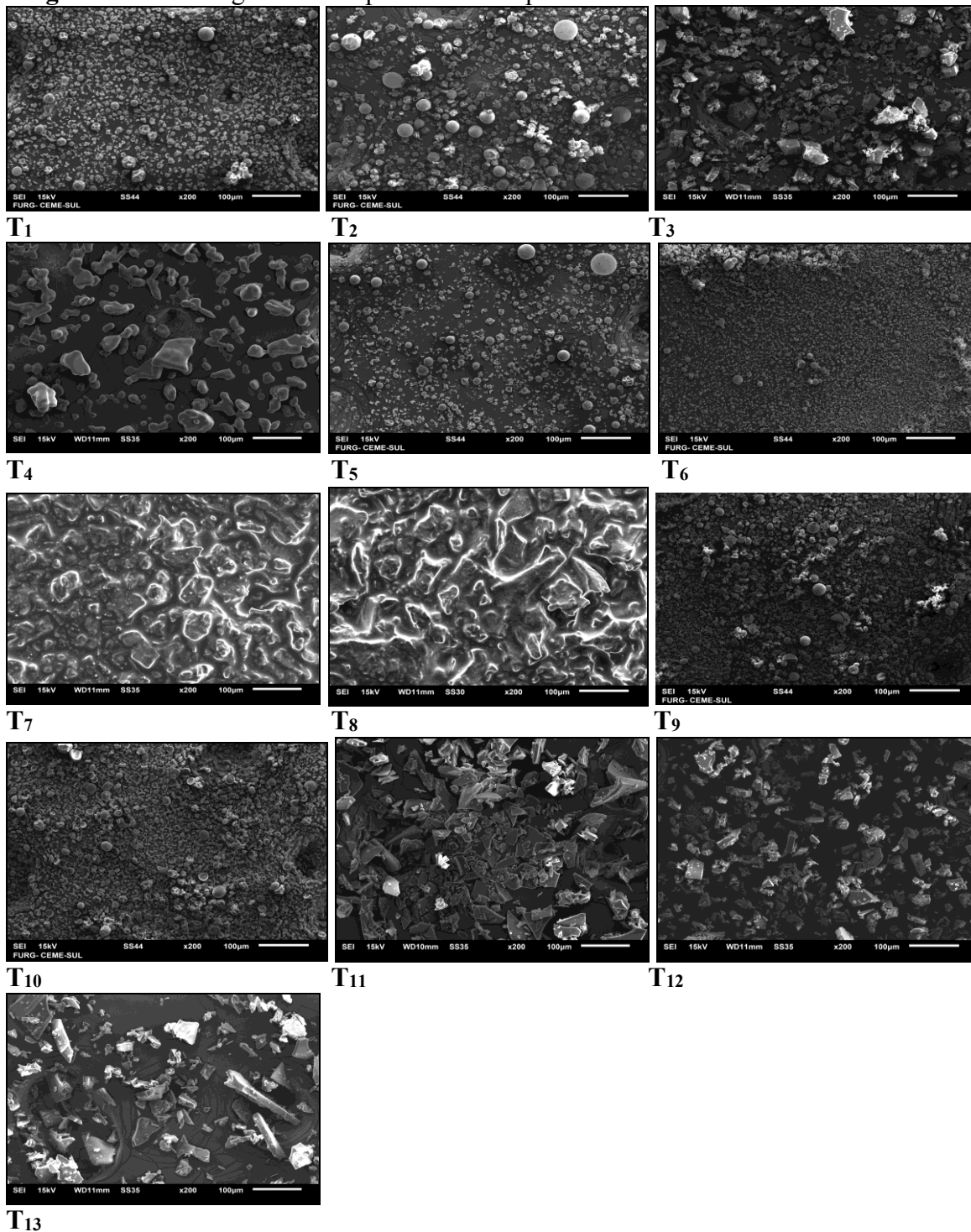


Ao analisar os valores do Potencial zeta (Pz) das nanoesferas, determinou-se que todas as formulações com maltodextrina e atomização, foram as mais negativas comparadas com os tratamentos de goma arábica, liofilização e emulsões, em especial os encapsulados de T₂ e T₉ com valores de -17,36 e -13,50, respectivamente. Em comparação com outras pesquisas determinou-se que os valores de potencial zeta de nossas nanoesferas estiveram dentro da faixa reportada por vários autores. Entre eles, Ameller et al. (2003) determinaram em nanopartículas com ácido poli ϵ -caprolactona e Tween 80, um valor de -20 mV. Ourique et al. (2008) determinaram em nanopartículas com ácido poli ϵ -caprolactona, óleo de semente de girasol e Tween 80, um valor de -8,38 mV. Gu et al. (2003) determinaram em nanopartículas com lipossomas, um valor de -16,1 mV. Fathi et al. (2013) determinaram em nanopartículas lipídicas e Tween 80, um valor de -5,42 mV e Li et al. (2010) determinaram em nanopartículas lipídicas, um valor de -17,5 mV. Portanto o potencial zeta de nossos resultados foram muito negativo, nesse conceito os encapsulados apresentaram uma boa mobilidade eletroforética entre as partículas e em contato com líquidos adquirem uma carga elétrica que pode influenciar na cinética de liberação e o destino biológico dos nanotransportadores; quando as partículas possuem carga positiva tendem a ser atraídas por cargas negativas de superfícies e componentes biológicas, e vice-versa. Este potencial elétrico

é chamado potencial zeta e é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão (HEURTAULT et al., 2003; TAMJIDI et al., 2013). Depois das análises destes resultados as melhores formulações para ser utilizados nos próximos estudos foram T₂ e T₉, e que podem ser considerados dentro da faixa das nanoesferas. O tamanho de partícula interfere no processo de difusão das nanopartículas pelo muco intestinal, para diâmetro de 14 nm permeiam-se no muco intestinal e entram em contato com os enterócitos em apenas 2 minutos. Para partículas, com 415 nm de diâmetro, demoram cerca de 30 minutos e para partículas com 1000 nm de diâmetros não são capazes de se difundirem pelo muco intestinal (HUSSAIN; JAITLEY; FLORENCE, 2001).

3.4 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS NANOPARTÍCULAS POR MEV

A análise da morfologia das nanopartículas obtidas durante o encapsulamento foram realizados usando a Microscopia de Varrido Eletrônico-MEV, como se apresenta na Figura 3. As formas variaram, onde as nanopartículas elaboradas com secagem por atomização e maltodextrina (T₅ e T₆), apresentaram uma forma esférica quase regular. As nanopartículas elaboradas com atomização e goma arábica (T₁ e T₈), apresentaram partículas que não eram esféricas e algumas apresentavam superfície enrugada em forma de flocos de diferentes tamanhos. As nanoesferas elaboradas por liofilização, maltodextrina e goma arábica (T₃, T₄, T₁₀, T₁₁ e T₁₃) apresentaram superfícies irregulares, lisas com forma de peças retangulares de diferentes tamanhos. As nanopartículas elaboradas com emulsões espontâneas de baixa energia (T₇ e T₁₂), apresentaram partículas espalhadas de forma heterogênea e aglomerados de partículas que se formam provavelmente durante a secagem, representados por pontos com maior superfície. Os resultados da morfologia das nanopartículas devem-se ao efeito das metodologias de encapsulamento, assim, para o tipo de secagem a solução aquosa das nanopartículas foi atomizada em micro gotas e durante a passagem pela câmara de secagem foram formadas em partículas esféricas. Para o tipo de secagem por liofilização não aconteceu nenhuma pulverização homogeneizada, so que precisava de uma homogeneização depois da secagem, provocando como resultado uma morfologia não esférica. Para o tipo da emulsão espontânea a fase orgânica foi elaborada sem força mecânica o que permitiu obter nanopartículas não homogeneizadas.

Figura 3 - Morfologia das nanopartículas encapsuladas.**T13**

T₁: ExS-GA-Atomização, T₂: ExS-MD- Atomização, T₃: ExS-GA-Liofilização, T₄: ExS-MD-Liofilização, T₅: ExS-GA/MD-Atomização, T₆: ExM-GA/MD-Atomização, T₇: ExS-Be-Nanoemulsão, T₈: ExM-Be-Nanoemulsão, T₉: ExM-MD-Atomização, T₁₀: ExM-GA-Atomização, T₁₁: ExM-GA-Liofilização, T₁₂: ExM-MD-Liofilização, T₁₃: ExM-GA/MD-Liofilização, GA: Goma Arábica, MD; Malto Dextrina, ExS: Extrato de Shiraz, ExM: Extrato de Merlot, Be: Baja energia

Nossos resultados tiveram morfologias similares aos reportados por Kuck e Noreña (2016), na encapsulação por atomização e liofilização, em casca de uva. Similar soa obtidos por Rocha-Parra et al. (2016), em encapsulação de fenólicos por secagem por atomização, similar a Carneiro et al. (2013), em encapsulação de óleo por secagem por atomização e similar Kosaraju et al. (2008), Fanga e Bhandaria (2010), onde apresentaram morfologia esférica uniforme sobre encapsulação de polifenóis com atomização.

3.5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DAS NANOESFERAS

Devido aos resultados apresentados anteriormente decidiu-se continuar o estudo com as nanoesferas denominadas T2, que correspondem ao resíduo de variedade Shiraz e as nanoesferas denominadas T9, que correspondem ao resíduo da variedade Merlot.

3.5.1 Umidade

Na Tabela 5 se apresenta os valores das propriedades físicas das nanoesferas.

Tabela 5 - Propriedades físicas das nanoesferas dos extratos de resíduos da vinificação.

Componentes		ExS-MD-Atomização (T ₂)	ExM-MD-Atomização (T ₉)
Umidade (%)		3,65±0,85 ^a	3,72±0,21 ^a
Atividade de água		0,279±0,012 ^a	0,266±0,021 ^a
Solubilidade		95,52±1,55 ^a	90,28±1,09 ^b
Higroscopicidade (%)		12,67±0,25 ^a	11,46±0,49 ^b
Molhabilidade (seg)		4,74±0,32 ^b	8,29±1,24 ^a
Grau de aglomeração (%)		2,62±0,99 ^b	3,25±0,65 ^a
Temperatura de transição vítrea (°C)		54,14±1,62 ^a	48,16±1,24 ^b
Cor	a*	4,37±0,66 ^b	9,74±0,35 ^a
	b*	5,96±1,12 ^a	-0,37±0,02 ^b
	L*	42,27±1,49 ^b	43,54±2,09 ^a
	C	7,39±1,30 ^b	9,75±0,35 ^a
	H	53,78±1,25 ^b	357,82±0,04 ^a

MD; Maltodextrina, ExS: Extrato de Shiraz, ExM: Extrato de Merlot, Letras minúsculas iguais nas linhas indicam que não há diferença estatística entre as amostras.

Os valores de umidade, avaliadas entre as duas nanoesferas dos resíduos da vinificação não apresentaram diferença variando entre 3,65% (T₂) e 3,72% (T₉). Estes resultados foram inferiores comparadas com os reportados por Tolun, Altintas e Artik (2017) na microcapsulação de polifenóis da uva usando maltodextrina e goma arábica, com mistura de maltodextrina e goma arábica (8;2) por atomização a 140 °C, que determinaram uma faixa entre 5,1 e 10,7%. Portanto puede definirse como uma nanoencapsulação microbiologicamente segura e ter um longo tempo de armazenamento. A variação da umidade das nanoesferas esta em função da concentração do material de parede sobre a matéria sólida da fase orgânica, os aumentos na concentração de maltodextrina levam a menores índices de umidade, Além disso, a maltodextrina, devido ao seu alta massa molecular, tem baixa higroscopicidade e reduz a temperatura de transição vítrea (QUEK; CHOK; SWEDLUND, 2007; SANTANA et al., 2017

3.5.2 Atividade de água

A atividade da água dos tratamentos T₂ e T₉, variaram de 0,279 a 0,266, portanto não foram significativamente diferentes um do outro, estes resultados comparados com os obtidos por Daza et al. (2016) foram similares aos nanoencapsulados com 10% de material de parede e 120 °C de secagem por atomização com um valor de 0,26, mais foram superiores a partir de 20% e 30% de material de parede (maltodextrina) com valores de 0,19 e 0,16 de atividade de água, respectivamente. Dos resultados pode-se deduzir que com maior concentração de material de parede vai se conseguir menor atividade de água nas nanocsfers. O conteúdo de umidade é diferente da atividade da água, pois representa a composição de água em um sistema alimentar, enquanto que a atividade da água mede a disponibilidade de água livre nos alimentos que é responsável por reações bioquímicas. Além disso, todos os tratamentos apresentaram valores de atividade de água inferiores a 0,3, indicando que são microbiologicamente estáveis e que não há crescimento microbiano abaixo deste valor.

3.5.3 Solubilidade

Os valores da solubilidade das nanoesferas, variaram em 95,52% e 90,28%, sendo diferentes um do outro, comparados com os obtidos por Boonchu e Utama-ang (2015), estiveram na faixa das microcápsulas dos compostos bioativos de resíduos de uva, para uma

concentração do 10% de maltodextrina um 92% e para 20% de maltodextrina um valor de 76% de solubilidade. Foram inferiores comparando e analisando, os resultados de Yousefi, Emam-Djomeh e Mousavi (2011), sobre as microcápsulas de suco de romã, onde determinaram que a solubilidade varia em função da concentração de material de parede, para um 12% maltodextrina um valor de 99,4% e para um 16,5% de material de parede um valor de 98,2% de solubilidade. Estes resultados tiveram o mesmo comportamento, já que na formulação das nanopartículas teve a mesma concentração de material de parede, mas de tipo e concentração de extrato diferente, o que levou a ter menor quantidade de sólidos T₂ porque seu extrato teve menos sólidos, no entanto não ocorreu com T₉ que foi um extrato com maior quantidade de sólidos, mas a concentração constante do maltodextrina justifica-se então que o resultado da solubilidade foi menor. De acordo com Jaya e Das (2004), o decréscimo da quantidade de maltodextrina aumenta a dispersibilidade e, portanto, a adição de maltodextrina prejudica a solubilidade dos nanopartículas.

3.5.4 Higroscopicidade

Os valores obtidos para a higroscopicidade das nanoesferas (T₂ e T₉) variaram entre 12,67% e 11,46%, foram muito próximos aos reportados por Kuck e Noreña (2016), sobre os microencapsulados de extratos de casca de uva, usando goma arábica, polidextrose e goma guar hidrolisada, que tiveram valores entre 11,67% a 16,61%. Também teve perto comparando com os obtidos por Souza et al. (2015) que encontraram valores de higroscopicidade entre 12,4% e 17,4% para microencapsulados com maltodextrina do pigmento de bagaço da vinificação de uva Bordo. Isso se deve ao fato da maltodextrina ser um material com baixa higroscopicidade e confirma a eficiência de seu uso como agente carreador, no sentido de reduzir a higroscopicidade de produtos desidratados do secagem por atomização. Quanto menor é a umidade das nanopartículas, maior será a higroscopicidade, ou seja, maior facilidade em adsorver água, o que está relacionado ao maior gradiente de concentração de água existente entre o produto e o ambiente.

3.5.5 Grau de aglomeração

Os resultados obtidos do grau de aglomeração das nanoesferas dos resíduos da vinificação (Tabela 5), foram inferiores aos encontrados por Jaya e Das (2004), que obtiveram valores entre 8,96 e 33,97% para manga em pó. Também menores aos reportados por

Martinelli, Gabas e Telis-romero (2007) que encontraram 21,11% e 24,6% de aglomeração para microencapsulados de limão com maltodextrina e goma arábica. Nossos resultados foram menores porque tivemos valores baixos de umidade, de sólidos solúveis e utilizamos pouca concentração de maltodextrina com menor DE. Quanto maior é a concentração de maltodextrina e menor o DE, menor o grau de aglomeração sendo mais fácil o processo de encapsulação, porque a principal causa da aglomeração é a indução da plasticização pela água presente na superfície do produto, esta água adsorvida na superfície forma uma solução saturada e torna as partículas pegajosas e capazes de formarem pontes líquidas (RIGHETTO; NETTO, 2005)

3.5.6 Molhabilidade:

A molhabilidade de nossas nanoesferas teve valores muito baixos entre 4,74 e 8,29 segundos, foram menores comparados as microencapsulas de polpa de mango com maltodextrina de 17,35 a 36,27 segundos, obtidos por Jaya e Das (2004). Também foram menores aos comparados por Jinapong, Supphantharika e Jamnong (2008), sobre encápsulados de leite de soja com maltodextrina de 42 segundos de molhabilidade. Este resultado é justificado pelo baixo valor de tamanho de partículas, de umidade, sólidos solúveis e liposolúveis, exponiindo maiores áreas em contato que permitem que as nanoesferas penetrem e se dispersem rapidamente na água, produzindo uma boa característica de instantaneização (GHOSAL; INDIRA; BHATTACHARYA, 2010).

3.5.7 Cor (a^* , b^* , L^* , H, C)

Os valores dos parâmetros cromaticos diferiram significativamente entre os dois tratamentos (T_2 e T_9). Os resultados de a^* e b^* , na formulação T_2 apresentaram-se menos vermelhos indo para o cor amarela e para T_9 apresentou um cor mais vermelho indo para azul. Respeito ao valor da cromaticidade (C), a nanoesfera do tratamento T_2 (7,39) apresentou menos pureza e saturação que a cápsula T_9 (9,85) que foi mais saturado. O valor do ângulo Hue (H) no tratamento T_2 foi de 53,78 resultando estar dentro da faixa de tonalidade mais amarelo (Hue amarelo: 90) e T_9 apresentou um valor de 357,82 resultando dentro da faixa do estímulo vermelho (Hue vermelho: 360). Em conclusão os resultados deste estudo foi que T_9 apresentou uma cor avermelhada de característica desejável e T_2 foi de uma coloração amarelada. Isto justifica-se pela presença do alto conteúdo de antocianinas

presentes no T₉, o que não aconteceu com T₂ onde foi muito baixo o conteúdo de antocianinas, portanto os valores cromáticos tiveram o mesmo comportamento. Estes resultados foram semelhantes aos encontrados sobre a microencapsulação por atomização com goma arábica do extrato de casca de uva Bordo, sobre microencapsulação por liofilização com maltodextrina do extrato e vinho da uva Cabernet sauvignon, reportados por Kuck e Noreña (2016), Souza et al. (2015) e Stoll et al. (2016), respectivamente.

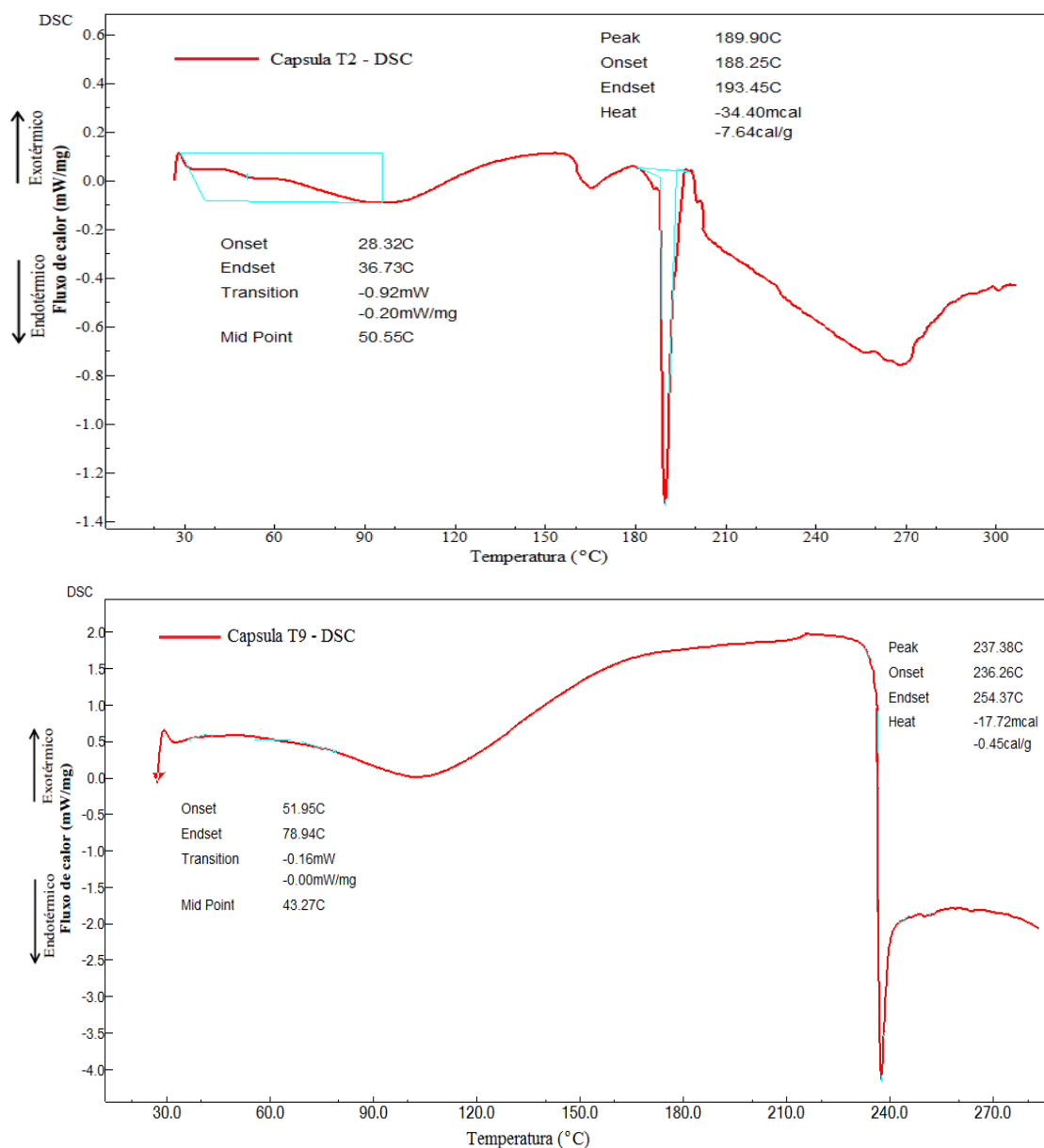
3.5.8 Análise de calorimetria diferencial de varredura (DSC)

A temperatura de transição vítrea (T_g) das nanoesferas variou entre 54,14 °C (T₂) e 48,16 °C (T₉), estes valores foram similares aos obtidos por Kuck e Noreña (2016), sobre a T_g dos pós microencapsulados: para extratos de casca de uva com 10% de goma arábica e secagem por atomização, que foi de 48 °C e para liofilização com 10% de goma arábica foi de 52,2 °C. Rocha-Parra et al. (2016) determinaram valores de T_g na mesma faixa quando avaliaram microencapsulação de vinho vermelho por liofilização com maltodextrina e goma arábica entre 50,96 °C e 55,89 °C. O valor encontrado neste trabalho justifica-se porque as duas nanoesferas T₂ e T₉, continham a mesma concentração de material de parede (10%), baixo valor de DE (15,5), ótimos parâmetros utilizados no método de encapsulação e diferente tipo de extrato. Além disso, uma apresentou mais coloração vermelha, maiores sólidos solúveis e mais conteúdo fenólicos que o outro, portanto acredita-se que estas propriedades físicas e fenólicas, levaram a obter estes resultados e entre as duas nanoesferas T₂ e T₉, uma pequena diferença em sua temperatura de transição vítrea. A transição vítrea de um encapsulado é afetada por vários fatores, concentração e composição molecular do biopolímero carreador, umidade, açúcares e ácidos, valores maiores destes levam a ter uma baixa temperatura de transição vítrea porque um ligeiro aumento destes componentes transforma-se o pó em um material pegajoso. Portanto a T_g é um indicador da estabilidade durante o armazenamento, quanto maior é o valor de T_g, maior é a estabilidade da nanoesfera. Para maltodextrina a maior equivalente de dextrosa (DE), menor é sua massa molecular e menor é a temperatura de transição vítrea (FERRARI et al., 2013; FERNANDES; BORGES; BOTREL, 2014; ADHIKARI et al., 2004)

Na Figura 4 apresentam-se os termogramas das nanoesferas selecionadas como os melhores tratamentos da nanoencapsulação obtidos dos extratos de vinificação. Realizou-se um análise DSC para avaliar o estado físico dos sistemas formados, ter

informação como estão dispersos os compostos fenólicos e conhecer as propriedades termodinâmicas das nanoesferas mediante sua avaliação da energia livre.

Figura 4 - Termograma das nanoesferas T₂ (Shiraz) e T₉ (Merlot) dos extratos de vinificação.



Na mesma Figura se mostra a curva calorimétrica de DSC das nanoesferas formuladas com extrato de resíduos da vinificação para a cápsula da variedade Shiraz (T₂), se observou a identificação das transições térmicas mediante uma representação da variação de energia com a temperatura, o termograma apresentou em sua primeira seção um salto da linha base que foi associado a temperatura de transição vítrea da nanoesfera de 50,55 °C (T_g),

provocando um pequeno deslocamento na temperatura de 165 °C. Na segunda seção apresentou um pico endotérmico que foi um processo que precisou calor para produzir-se um ponto de fusão de 190 °C da fase cristalina de um polímero semicristalino, além disso, observou-se valores de energia de -7,64 Cal/g. Na terceira seção começou a se produzir um processo exotérmico com desprendimento de calor a partir dos 270 °C este fenômeno é conhecido como degradação das nanoesferas. Para a nanoesfera formulada com extrato de resíduos da vinificação variedade Merlot (T₉) apresentou um termograma conformado por um salto da linha base associado à temperatura de transição vítrea de 43,27 °C (T_g). Seguindo esta curva apresentou um pico endotérmico produzindo um ponto de fusão de 237,63 °C e calor gerado de -0,445 Cal/g. Na última seção da curva começou o processo exotérmico com desprendimento de calor por combustão a partir dos 255 °C, fenômeno conhecido como degradação. Nossos resultados foram ligeiramente menores aos obtidos por Teli e Martines-Navarrete (2009), sobre o estudo da microencapsulação por liofilização de suco de uva com maltodextrina para DE(4-7,07) um T_g de 69,5 °C, para DE(16,5-19,5) um T_g de 65 °C. Também teve muito perto aos reportados por Shrestha et al (2007), na microencapsulação de suco de laranja por spray drying com maltodextrina DE (6) um T_g de 66,4 °C. Também foi muito semelhante ao reportado por Kuck e Noreña (2016), sobre a microencapsulação dos extratos de casca de uva por atomização com goma arábica teve um valor de T_g de 52 °C. Respeito ao calor de gerado de nossas nanoesferas de -7,64 Cal/g (-3197 J/g) e -0,45 Cal/g (-1,88 J/g) foram inferiores aos obtidos por Balanč et al. (2016) sobre nanopartículas de resveratrol com lipossomas de (1,0 - 49,4 J/g).

Analisando os resultados da termografia estes indicaram um comportamento de fusão de substâncias impuras de composição polimérica. Analisando os dados da primeira seção de T_g indicaram que a estabilidade desta nanoesfera encontrou-se por cima da temperatura ambiente permitindo ter uma segurança das nanoesferas sobre o armazenamento a temperatura ambiente. Sobre a segunda seção do ponto de fusão indicou que a nanoesfera esteve formada por uma substância polimérica impura, ficando demonstrado que as nanoesferas estiveram conformados por uma mistura de metabolitos fenólicos antioxidantes incluindo o material de parede e estiveram na mesma faixa do ponto de fusão de substâncias puras de fenólicos. A T_g esta relacionados com a umidade, massa molecular e estrutura química, que se torna maior à medida que o peso molecular médio dos solutos aumenta e alimentos ricos em açúcares normalmente apresentam alta susceptibilidade ao colapso por estar ligado a baixos valores de T_g (Fabra et al., 2009; Telis; Martines-Navarrete, 2009). Outro efeito dos resultados foi que o T_g de maltodextrina muda dependendo da hidrólise da dextrose

equivalente (DE), assim para um valor de DE igual a 6 ($T_g=197,7\text{ }^{\circ}\text{C}$) e 33 de DE ($T_g=102,8\text{ }^{\circ}\text{C}$), pode-se atribuir a T_g de maltodextrina e a ruptura de ligações de hidrogênio com água, o comportamento térmico sugere que os fenólicos estão dispersos na matriz polimérica no estado amorfo e a alteração observada na T_g da nanoesfera é devida às interações entre o polímero e os fenólicos (Hung et al., 2007; Descamps et al., 2009)

3.6 RENDIMENTO DA NANOENCAPSULAÇÃO

A valiação do rendimento da nanoencapsulação das duas nanoesferas (T_2 e T_9) dos resíduos da vinificação (Tabela 6), apresentaram diferença estatística entre elas. Esta diferença foi produto do tipo do extrato utilizado para o encapsulamento, ou seja o T_2 foi preparado com um extrato do resíduo de uva, variedade Shiraz procedente da vinificação e o T_9 da variedade Merlot, estes resultados justifica-se porque durante a avaliação destes extratos aquosos determinou-se que o Shiraz teve maior conteúdo de flavonóides, menor em fenólicos e antocianinas totais, que o Merlot. No entanto a relação da composição fenólica e antioxidante antes da nanoencapsulação manteve-se durante e depois do processo de encápsulamento, por isso que o rendimento da nanoencapsulação entre as duas nanoesferas variaram significativamente entre um e outro tratamento. Para a análise do rendimento de cada componente explica-se, que para o processo de encapsulação foram preparados, utilizando uma mesma concentração de maltodextrina e os mesmos parâmetros de secagem por atomização.

Tabela 6 - Rendimento da nanoencapsulação das nanoesferas em função dos compostos fenólicos e atividade antioxidante.

Componentes/atividade	T_2 (Shiraz)	T_9 (Merlot)
Antocianinas totais	$71,49\pm 5,72^a$	$77,15\pm 0,76^a$
Fenólicos totais	$75,45\pm 6,24^a$	$90,36\pm 4,77^b$
Flavonóides totais	$91,55\pm 3,22^a$	$72,78\pm 4,90^b$
AA-DPPH	$96,22\pm 0,88^a$	$72,32\pm 1,71^b$
AA-ABTS	$75,57\pm 0,20^a$	$60,69\pm 0,45^b$

AA-DPPH; Atividade antioxidante pelo método de DPPH, AA-ABTS; Atividade antioxidante pelo método de ABTS, Letras minúsculas iguais nas colunas indicam que não há diferença estatística entre as amostras.

Comparando os valores de 71,49% e 77,15%, da rendimento de encapsulamento de antocianinas totais, foram menores que os reportados por Kuck e Noreña (2016), sobre o 87% de rendimento da nanoencapsulação de resíduos de casca de uva bordo com 5% de goma arábica e 5% polidextrosa e atomização a 140 °C de secagem, mas foram maiores comparados com os reportados por de Souza et al. (2015), sobre o 52,56% de retenção de antocianinas na encapsulação por liofilização com maltodextrina. Os resultados obtidos no presente estudo sobre os fenólicos totais foram de 75,45% e 90,36%, e sobre os flavonóides totais foram de 91,55% e 72,78% de rendimento de encapsulação. Estes resultados foram superiores aos reportados por Aizpurua-Olaizola et al. (2016), sobre 30% de eficiência de encapsulação de polifenóis de resíduos de uva obtidas com um encapsulador Buchi B-390 utilizando solução de alginato de sódio. Também foram maiores aos reportados por Boonchu e Utama-ang (2015), sobre o 31,45% e 18,75% de rendimento de encapsulação de fenólicos totais e flavonóides, de resíduos da uva vermelha por liofilização com maltodextrina e carboximetilcelulose (CMC). Nossos resultados estiveram dentro da faixa obtidos por Kuck e Noreña (2016), sobre os fenólicos totais de (81,37% a 95,32%) de rendimento da encapsulação. Respeito à rendimento de encapsulamento da atividade antioxidante determinou-se para DPPH (96,22% e 72,32%) e para ABTS (75,57% e 60,69%), estes valores forma superiores aos reportados por Kuck e Noreña (2016), sobre a faixa de (45,43% a 57,31%) da encapsulação de uva bordo com goma arábica e polidextrosa, com secagem por liofilização e atomização. A explicação da variação destes resultados, deve-se à seleção dos parâmetros de encapsulação pretendendo obter nanopartículas, onde o material de parede é um polímero muito importante para manter o núcleo dentro da nanoesfera, dependendo do tipo e concentração do biopolímero vai se obter propriedades físicas-químicas variáveis desde um rendimento de nanoencapsulação ate um tamanho de partículas. A massa molecular dos biopolímeros é um fator que permite a interação e quelação dos grupos hidroxilos frente às moléculas antioxidantes (núcleo), a nanocapsulação criadas com polímeros de peso molecular médio ou alto permitem obter maiores rendimento de encapsulamento em comparação com as de baixa massa molecular (BALANC et al.; 2016; ALSBERG et al., 2003).

3.7 AVALIAÇÃO DA DIGESTÃO GASTRO-INTESTINAL “*IN-VITRO*”

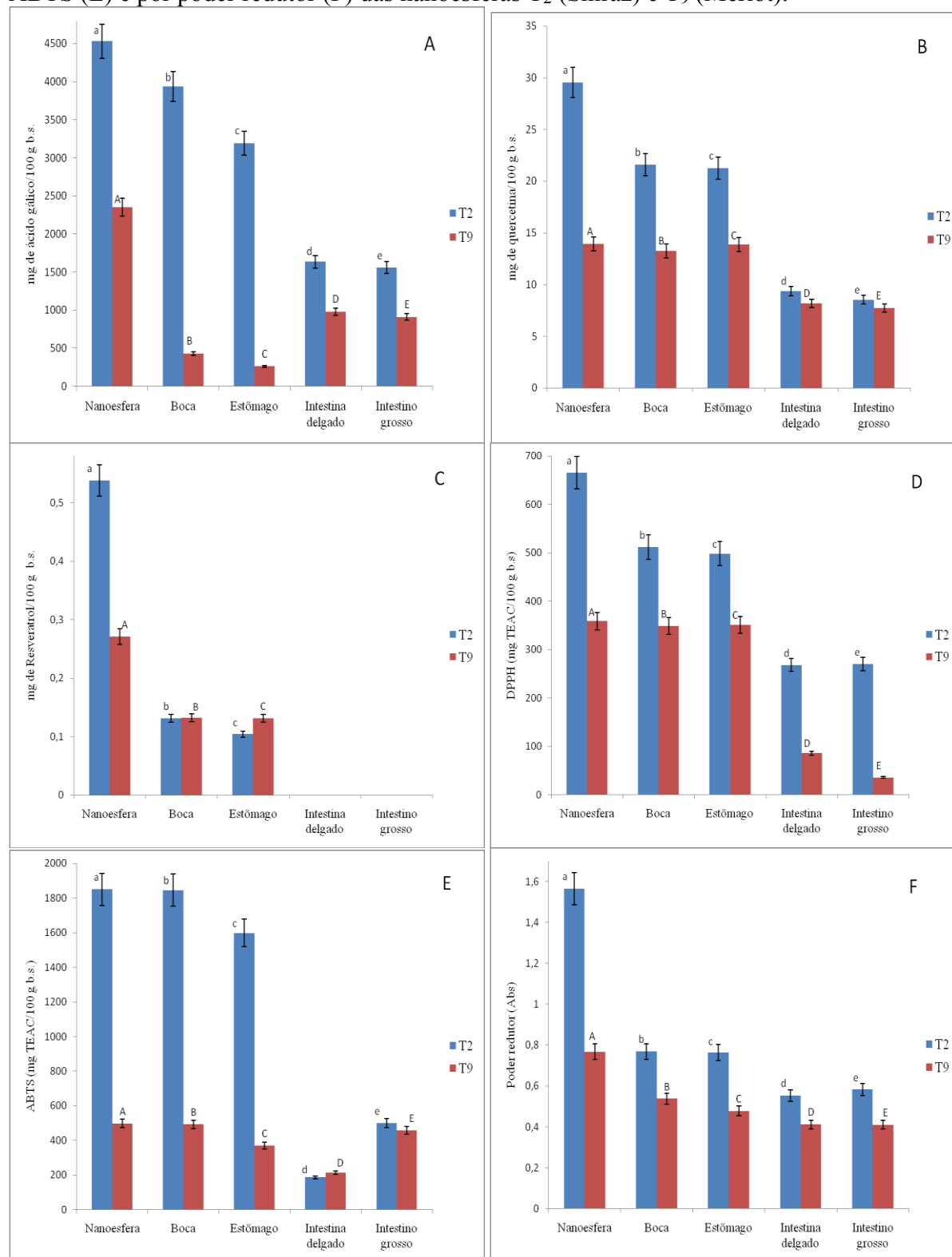
A avaliação da digestão gastrointestinal *in-vitro* das moléculas nanoencapsuladas dos resíduos da vinificação foram realizadas em quatro fases do trato

gastrointestinal (boca, estômago, intestino delgado e intestino grosso), para determinar a liberação dentro do corpo humano dos compostos fenólicos e da atividade antioxidante apresentada pelas nanoesferas (Figura 5).

Observou-se que existiu diferença estatística entre as nanoesferas e em cada um das fases, Nas nanoesferas (T₂) o valor dos fenólicos e flavonóides totais liberados, aconteceu mais na boca e o estômago durante a digestão gástrointestinal, produzindo uma maior resistência ao sistema de liberação no intestino delgado e grosso. Estes resultados apresentaram o mesmo comportamento aos obtidos por Villela-Castrejon, Acosta-Estrada, Gutierrez-Uribe (2017) onde na fase da boca aconteceu a máxima liberação e nas outras fases so ligera diminuição sobre a digestão gastrointestinal dos encápsulados com maltodextrina de compostos fenólicos.

No entanto para a nanoesfera (T₉) existiu ligera liberação de fenólicos na boca e o estômago, mas teve maior quantidade de liberação no intestino delgado e grosso, e sobre os flavonóides teve maior liberação na boca, no estômago e menor no intestino delgado e grosso. Estes resultados foram muito similares se comparadas com a digestão de compostos fenólicos de resíduos de uva obtidos por Wang et al. (2016), onde determinaram que o conteúdo de fenólicos diminui desde a fase gástrica até a fase pancreática. Destes resultados pode-se justificar o seguinte, a liberação dos compostos fenólicos depende da composição do do principio ativo e do polímero como material de parede, nesta parte a composição fenólica do extrato de T₂ teve maior conteúdo de flavonóides que T₉, portanto os encápsulados em presenca de um médio ácido de pH (2,0-3,0) na fase gástrica alguns flavonóides hidrolisados quebraram suas ligações com o material de parede, ficando livres e soluvéis, chegando a representar os fenólicos liberados. Neste sentido as nanopartículas podem ser formuladas para uma liberação direcionada a um sitio ativo seja ao sistema linfático, coração, fígado, pâncreas, rim, cérebro, baço, ou preparadas para serem administradas na circulação sistêmica prolongada. Para ter este efeito o polímero deve ser biodegradável para compor cápsulas de sistemas nanoparticulados com boas características de tamanho, eficiência de encapsulação, o potencial zeta (carga da superfície) e características de liberação (KUMAR; RAVIKUMAR; DOMB, 2001). Estes polímeros na digestão gastrointestinal sofrem degradação por hidrólise de suas cadeias em átomos metabolizáveis que entraram no ciclo de Krebs, e são degradados a carbono e água, sendo excretados pelas vias normais de eliminação (VILLANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010).

Figura 5 - Comparação da liberação durante a digestão gastrointestinal de compostos fenólicos (A), flavonóides (B), Resveratrol (C) e atividade antioxidante por DPPH (D), por ABTS (E) e por poder redutor (F) das nanoesferas T₂ (Shiraz) e T₉ (Merlot).



A liberação do conteúdo de resveratrol para as nanoesferas T₂ e T₉, foi desenvolvida apenas na fase da boca e o estômago, permanecendo quase constante nas duas fases. Nas fases do intestino delgado e grosso, não foi quantificado, justifica-se porque nesta parte o resveratrol encontrou-se em um médio de pH 6,0-8,0 adequado para sua resistência a ser liberado, mas ficou muito ligado aos polímeros de encapsulamento. Ao respeito Koga et al. (2016), reportaram dados sobre encapsulamento de resveratrol e determinou que o encapsulamento tem proteção do *trans*-resveratrol em todo o sistema de digestão e permite a liberação direta do composto com a entrega do resveratrol ao intestino e com a absorção do metabolismo definitivo. Respeito ao comportamento da atividade antioxidante também as nanoesferas apresentaram diferença significativa em cada fase da digestão gastrointestinal e logicamente teve muita relação com a presença dos fenólicos e flavonóides. Na nanoesfera T₂ as atividades DPPH, ABTS e poder redutor, sua resistência a liberação diminuíram desde a boca até intestino delgado e ao final da fase aumentou a liberação no intestino grosso de maneira significativa para ABTS e levemente para DPPH e poder redutor. No entanto, na nanoesfera T₉ o comportamento de liberação da atividade antioxidante de DPPH e poder redutor foram diminuindo desde a fase oral até fase do intestino grosso, mais não aconteceu com o método ABTS que teve resistência no intestino delgado e mais liberação no intestino grosso, estes resultados foram de similar comportamento comparado com os obtidos por Sessa et al. (2011), em ensaios do FRAP (atividade do poder de redução Ferrico) sobre nanopartículas de resveratrol com tamanho nanômetro (128-138 nm) onde reportaram uma diminuição depois da digestão gástrica e intestinal. Nossas nanoesferas tiveram tamanho de partículas T₂ (112,63 nm) e T₉ (202,33 nm) que pode-ser considerado como uma nanoesfera e que este dado físico possivelmente possa estar contribuindo a ter este mesmo comportamento, sobre a quantificação dos compostos fenólicos das nanoesferas no estômago e intestino delgado.

A liberação dos compostos fenólicos das nanoesferas pode mudar obtendo resultados de alta ou baixa liberação dentro de um processo de digestão gastrointestinal e pode ser direcionado para um site ativo específico para atuar como um potente nano-misil dentro do corpo humano, levando este núcleo a níveis celulares. Neste sentido, as nanoesferas obtidas neste estudo demonstraram boa resistência de liberação ainda em meios alcalinos e ácidos, desde a boca de um pH 6,0-6,5, estômago de pH 2,5-3,0, intestino delgado de pH 6,5-7,0 e intestino grosso de pH 7,5-8,0. Também foi observado a partir dos resultados que provavelmente houve interações de tipo fenólico-proteína e fenólico-enzimas, mediante ligações de pontes de hidrogênio, hidrofóbicas ou iônicas, produzindo algumas quelações

moleculares e eliminando na forma de precipitados, que ao momento da quantificação dos compostos fenólicos elas ficaram isoladas. Este estudo foi iniciado em condições que imitam a cavidade bucal, então, quando o pH diminuiu e o número de eletrólitos aumentou (como ocorre no compartimento gástrico), eles se aglomeraram. No final, sob um pH intestinal, as nanopartículas voltaram a aparecer. Portanto, é provável que as nanopartículas possam ser encontradas no epitélio de absorção intestinal. Sobre isto Charlton et al. (2002), descreveram que a saliva humana esta conformada por água, proteínas, enzimas e compostos inorgânicos. Conhece-se que os polifenóis podem ter efeitos prejudiciais, incluindo sequestro de ferro, inibição da atividade de enzimas digestivas, precipitando glicoproteínas e produzindo dano de biodisponibilidade no trato gastrointestinal (KUBOTA et al., 2010). Existem três mecanismos de interação: hidrófobos, hidrogênio e pontes iônicas, as interações entre proteínas e compostos fenólicos dependem das ligações de hidrogênio que ocorrem entre as funções carbonílicas de alguns resíduos de prolina nas proteínas e os grupos OH dos quatro anéis fenólicos (ROSSETTI et al., 2008). A interação de compostos fenólicos por ligações C-C com proteínas (glicoproteínas da saliva) e α -amilase salivar foram pesquisadas mediante técnicas de cromatografia, turbidez, dispersão da luz, microscopia eletrônica, ressonância magnética nuclear. Todos estes métodos coincidem na observação de complexos estáveis que na maioria, formam precipitados (MCRAE; KENNEDY, 2011). No estômago o ácido clorídrico do suco gástrico atua na desnaturação de proteínas, onde a pepsina cliva em grandes peptídeos e alguns aminoácidos livres, estes produtos são absorvidos no intestino delgado, mediados por enzimas do intestino e do pâncreas, e as frações não digeridas passam a funcionar como fibra ou são degradadas por microorganismos presentes no intestino grosso. Os compostos fenólicos livres inibem várias enzimas digestivas, esses compostos estão envolvidos nas ligações da lignina com os carboidratos da parede celular e essa associação reduz a digestibilidade. Portanto, os compostos fenólicos precipitam as proteínas formando um revestimento hidrofóbico, semelhante a complexação tanino-proteína (CARBONARO et al., 2000; KUBOTA et al., 2010).

3.8 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO E LONGEVIDADE EM *IN-VIVO* COM *C. elegans*

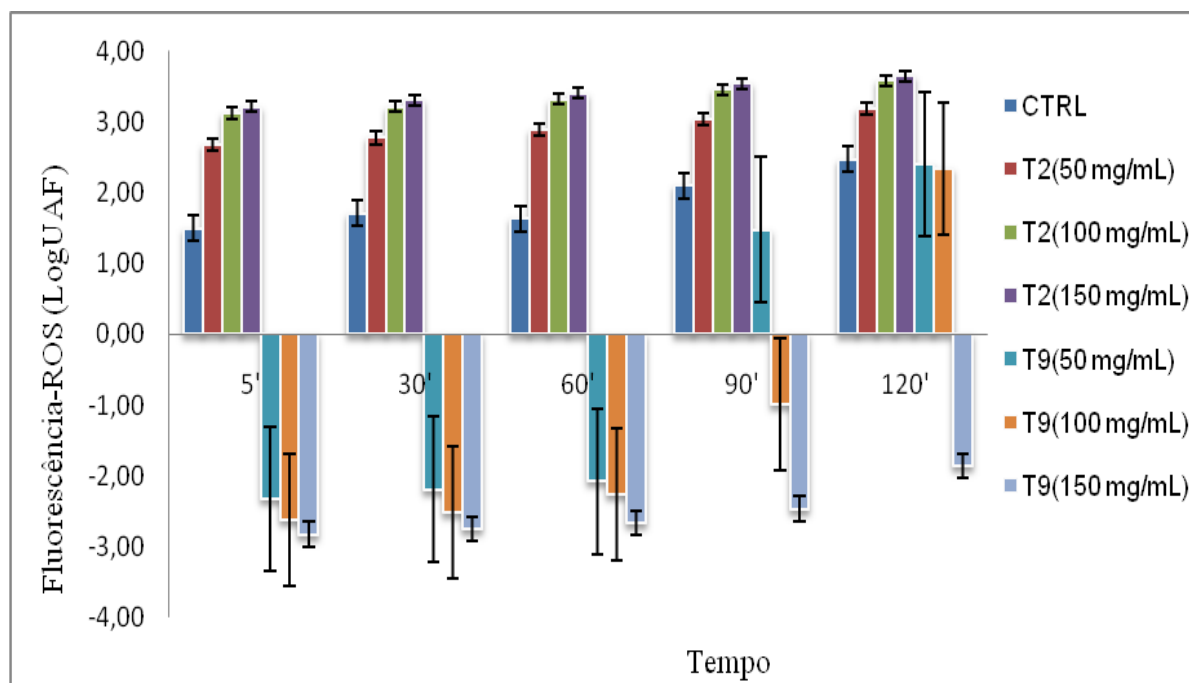
Os resultados obtidos nos artigos 1 e 2 demonstraram que o resíduo da vinificação em suas variedades Shiraz e Merlot, são boa fonte de metabolitos secundários multifuncionais como antioxidantes naturais. Também os extratos destes resíduos

transformadas em nanoesferas neste presente artigo demonstraram que tem alta atividade antioxidante e alto conteúdo de fenólicos e flavonóides totais. Assim, neste artigo foi estudado o efeito biológico *in vivo* das nanoesferas dos resíduos da vinificação sobre o estresse oxidativo e longevidade induzidas em linhagens de tipo selvagem de *C. elegans*. As formulações das nanoesferas T₂, feitas com extrato Shiraz e T₉ feitas com extrato Merlot foram escolhidas como melhores tratamentos. Para conhecer os efeitos biológicos das dois nanoesferas T₂ e T₉ foram testados com 10 uL das concentrações de 50, 100 e 150 mg/mL, respectivamente.

3.8.1 Estresse oxidativo em *C. elegans*

Na Figura 6 mostram-se os efeitos das nanoesferas T₂ (Shiraz) e T₉ (Merlot), sobre o estresse oxidativo, com 10 uL das concentrações de 50, 100 e 150 mg/mL, respectivamente.

Figura 6 - Avaliação *in vivo* da redução do estresse oxidativo (Ros-DCFDA) em *C. elegans* frente as nanoesferas dos resíduos da vinificação.



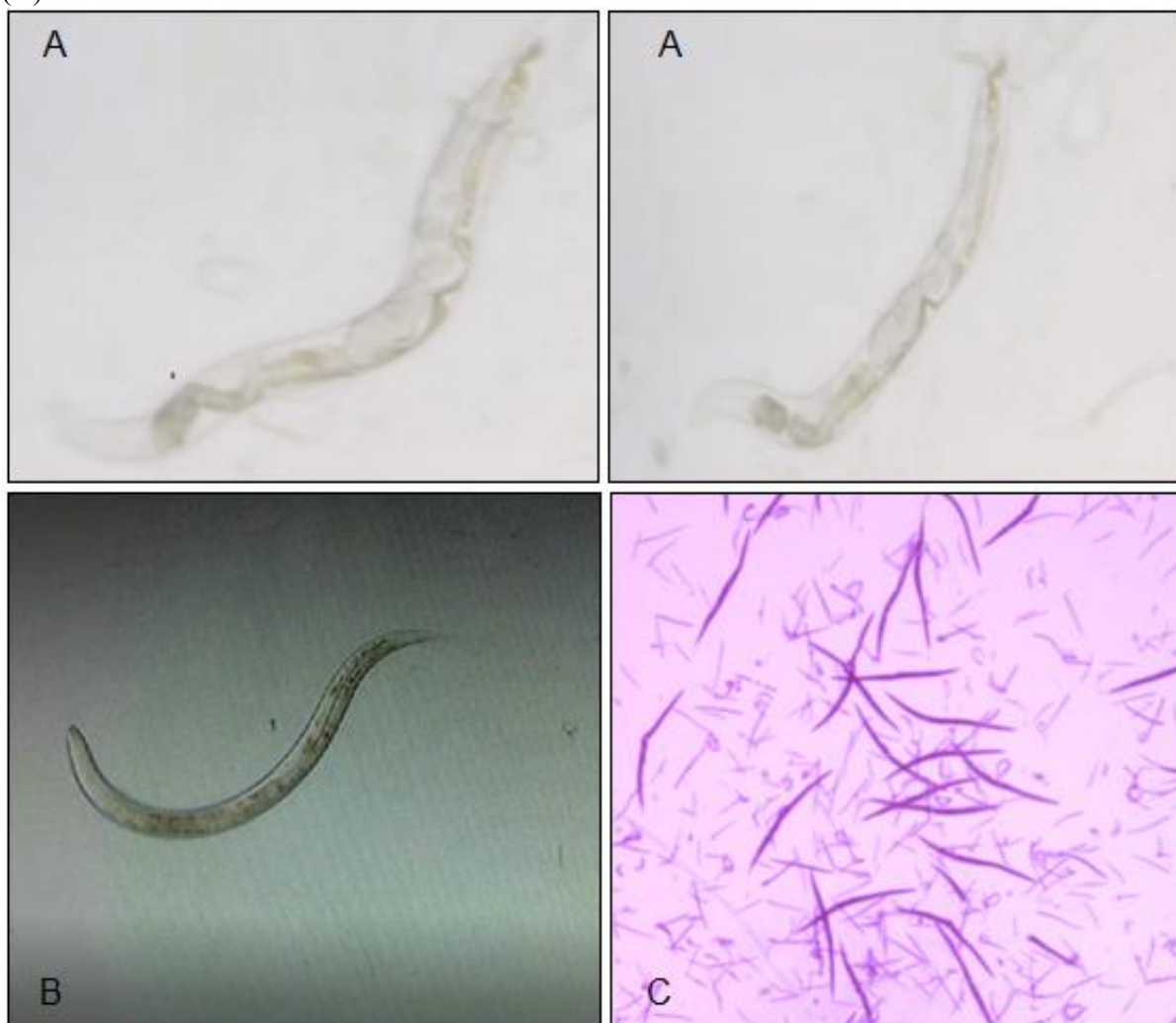
Observou-se que existiu diferença estatística entre as amostras ($p < 0,005$) e que o grupo de nanoesferas (T₂) nas concentrações de 50, 100 e 150 mg/mL, apresentaram um aumento da produção de espécies de oxigênio reativas (ROS) na massa de *C. elegans*.

comparadas frente ao controle, dito aumento foi proporcionalmente maior a medida que o tempo transcorreu desde 5 até 120 minutos. Portanto o comportamento do ROS foi diferente para as nanoesferas (T₉) em todas suas concentrações e variaram em função do tempo, assim nos tempos de 5, 30 e 60 minutos não teve produção de ROS pelo contrario as nanoesferas atuaram como inibidor das espécies de oxigênio reativas, originando um baixo valor de fluorescência. Aos 90 minutos o comportamento virou onde o T₉ (50 mg/mL) começou a produzir ROS sendo apenas um pouco menor que o controle, o que não aconteceu com as outras concentrações que continuaram reduzindo o ROS na massa dos animais, aos 120 minutos aconteceu que a medida que a concentração da nanoesfera aumentou estas tornaram-se tóxicas levando a maior produção de ROS nos *C. elegans*. De todo esse comportamento, pode-se mencionar para um controle do estresse oxidativo em organismos vivos como modelo em *C. elegans* que é importante a dose de concentração das nanoesferas, porque neste estudo foi demonstrado que a nanoesfera (T₂) apresentou alto conteúdo de compostos fenólicos e alta atividade antioxidante, maior que a nanoesfera (T₉). Portanto ficou demonstrado que para altas concentrações de fenólicos, flavonóides e de atividade antioxidante, as nanoesferas vão atuar como pro-oxidantes, como ocorreu no tratamento T₂, que foram cápsulas formuladas com extrato de resíduo de vinificação da variedade Shiraz. Também ficou demonstrado que nas concentrações moderadas de fenólicos, antocianinas e atividade antioxidante, as nanoesferas se comportaram como antioxidantes ao inibir os radicais livres da produção do ROS na massa de *C. elegans*. O comportamento dos resultados de T₉(50 mg/mL) e T₉(100 mg/mL) nos tempos de 90 e 120 minutos, foram similares aos reportados por Lima et al. (2014) sobre a redução dos níveis do ROS em *C. elegans* com extratos de mate de *Ilex paraguariensis*. Todos os resultados do T₂ foram similares aos obtidos por Charão et al. (2015) sobre avaliação da produção de ROS durante 100 minutos após da exposição com nanopartículas lipídicas em na massa de *C. elegans*. O fundamento destes resultados é que as espécies reativas de oxigênio são moléculas caracterizadas por apresentar um ou dois elétrons desapareados em seu orbital mais externo e ao menos uma molécula de oxigênio, o que as faz extremadamente reativas, atacam a moléculas com alta instabilidade eletrônica como átomos de nitrogênio das proteínas, ácidos nucleicos (ADN e ARN). A geração do ROS no *C. elegans* se produz em diferentes partes da célula do animal como resultado das reações metabólicas, sendo a principal fonte de geração do ROS a mitocôndria, na cadeia de transporte de elétrons onde entre 0,125 e 2% do oxigênio é convertido em ROS (HERRERO; BARJA, 2000; MULLER et al., 2000).

3.8.2 Longevidade em *C. elegans*

Neste estudo, os animais tipo selvagem foram tratados desde L1 por todo o tempo de vida, tratadas com 7,5 uL das concentrações de 50, 100 e 150 mg/mL, das nanoesferas de T₂ e T₉, e o número de animais vivos foram contados diariamente. A primeira etapa que se realizou foi uma sincronização dos animais para islar a massa de ovos, em termos de horas e ter nematóides no estado L1 e em essas condições poder começar o teste de longevidade nos nematóides (Figura 7C).

Figura 7 – Nematóide adulto-L4, sometidos ao efeito das nanoesferas T₉ na concentração de 50 (mg/mL) com 37 dias de vida (A), Nematóide controle L₁ (B), Nematóides sincronizados (C)

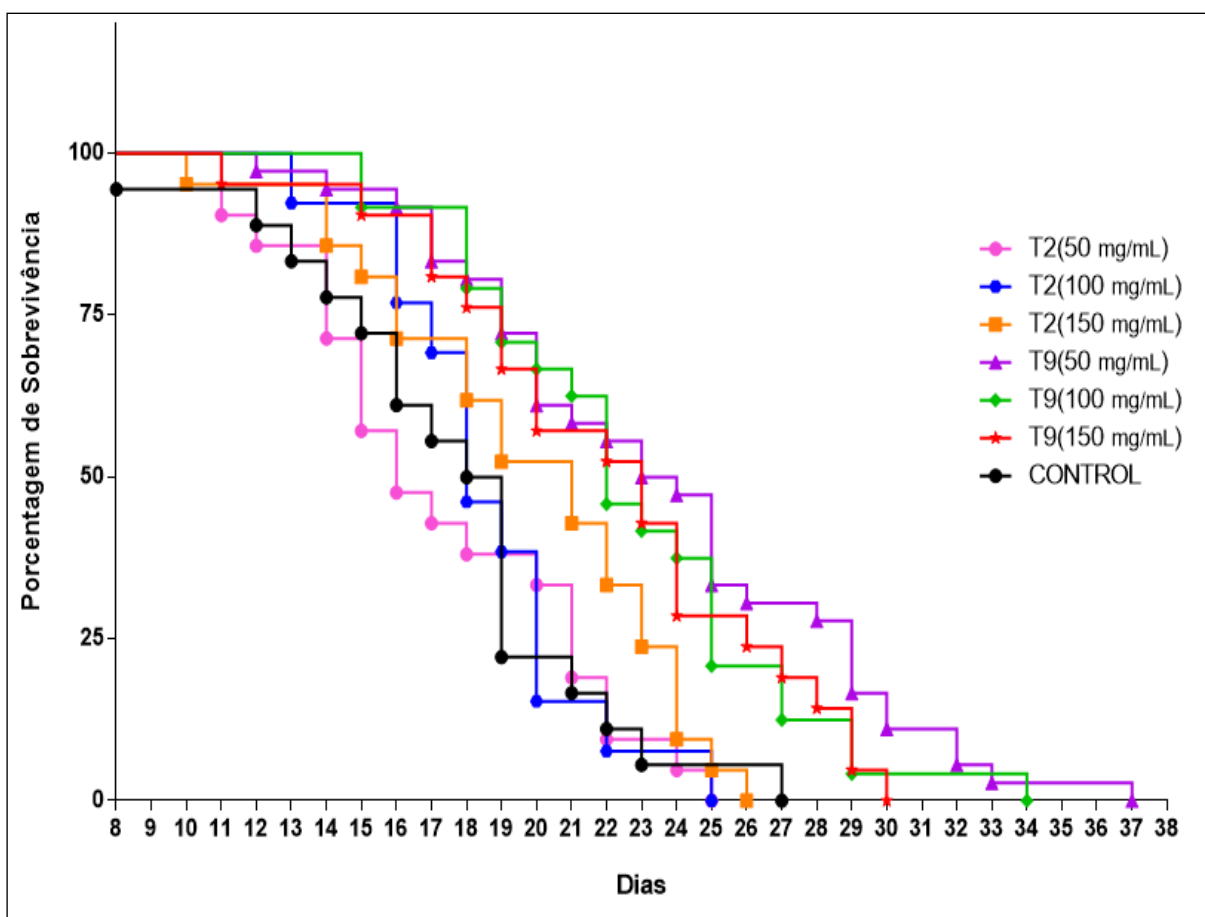


Na Figura 8 e Tabela 7, apresentam-se os resultados obtidos do experimento realizado a 20 °C e as curvas de sobrevivência de *C. elegans* do tipo selvagem (N2) tratadas com concentrações de nanoesferas de T₂ (50 mg/mL), T₂ (100 mg/mL), T₂ (150 mg/mL), T₉

(50 mg/mL), T₉ (100 mg/mL) e T₉ (150 mg/mL), respectivamente. Todas as amostras comparadas com o controle apresentaram diferença estatística.

Pode-se observar que as nanoesferas T₂ (50, 100 e 150 mg/mL) tiveram menor tempo de sobrevivência média (16, 18 e 21 dias, respectivamente) que o controle (18,5 dias), também encontraram-se tempos de longevidade baixo a sobrevivência máxima (25, 25 e 26 dias) que o controle (27 dias), portanto a porcentagem da redução da sobrevivência média respeito ao controle foi de (-13,51, -2,70 e 13,51%), mais nenhum a amostra desse grupo de tratamentos superou a sobrevivência máxima do controle.

Figura 8 – Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier dos nematóides *C. elegans* do tipo selvagem (N2), tratados com nanoesferas dos resíduos da vinificação. T₂ (Shiraz) e T₉ (Merlot), em diferentes concentrações.



Sobre a análise dos resultados do outro grupo, o tratamento T₉ (50, 100 e 150 mg/mL), obtiveram-se ótimos resultados de longevidade, com maior tempo de sobrevivência média (23,5, 22 e 23 dias, respectivamente) que o controle (18,5 dias), além de resultaram ter maior tempo de sobrevivência máxima (37, 34 e 30 dias) superando ao controle (27 dias)

sendo a porcentagem da redução da sobrevivência média por cima do controle que foi de (27,03, 18,92 e 24,32 %). A nanoesfera T₉ (50 mg/mL) apresentou o maior tempo de longevidade comparada com os demais tratamentos e com o controle, com 37 dias de sobrevivência, superando muitos estudos sobre o efeito biológico de sobrevivência em organismos de *C. elegans*. Dos resultados obtidos *in-vivo* pode-se verificar que, para que os organismos do *C. elegans* apresentem maior tempo de sobrevivência (longevidade) é importante a consideração da qualidade e quantidades de moléculas fenólicas e antioxidantes, a ser adicionado na sua alimentação.

Tabela 7 - Efeito das nanoesferas sobre a longevidade do *C. elegans* tipo selvagem

Grupos	Sobrevivência Média (Dias)	Sobrevivência Média (Dias) Maxima	Porcentagem de redução da Sobrevivência Média ao controle	Log-Rank <i>p-value</i>	n
Controle	18,5	27	-	-	
T ₂ (50 mg/mL)	16	25	-13,51	<0,0001	100
T ₂ (100 mg/mL)	18	25	-2,70	<0,0001	100
T ₂ (150 mg/mL)	21	26	13,51	<0,0001	100
T ₉ (50 mg/mL)	23,5	37	27,03	<0,0001	100
T ₉ (100 mg/mL)	22	34	18,92	<0,0001	100
T ₉ (150 mg/mL)	23	30	24,32	<0,0001	100

T₂: Nanocápsulas de extrato Shiraz, T₉: Nanocápsulas de extrato Merlot

Em nosso estudo determinou-se que a maior concentração de metabólitos fenólicos e antioxidantes, permitiram obter menor tempo de sobrevivência, ao parecer na maior concentração estes metabólitos atuam como pro-oxidantes provocando um estresse oxidativo a nível mitocondrial da célula do *C. elegans*, produzindo elétrons não apareadas manifestando-se como radicais livres, originando a morte antecipada dos animais. Foi possível comparar este mecanismo com o resultado do controle. Dos resultados do grupo de nanoesferas T₉ em sua caracterização físicoquímica demonstraram conter menor quantidade de fenólicos, flavonóides e menor capacidade antioxidante do que as nanoesferas T₂. Nesta parte determinou-se que as nanoesferas de T₉ (50 mg/mL) produziram 37 dias de longevidade

frente aos 25 dias do controle, obtendo um porcentagem de 27,03% mais de sobrevivência dos organismos vivos do *C. elegans* (Figura 7A). Os resultados de nosso estudo mostraram maior tempo de sobrevivência que os reportados por Chen et al. (2013b), onde prolongou-se a vida útil em 10,5% de *C. elegans* suplementados com trigo roxo rico em antocianinas. Também foi superior aos reportados por Amigoni et al. (2017) que determinaram um controle de 23 dias e com extrato de café verde uma sobrevivência dos *C. elegans* de 29 dias. Também foram superiores aos reportados por Lima et al. (2014) frente a utilização de extratos de *Ilex paraguariensis* (erva mate), obtendo até 25 dias de sobrevivência dos *C. elegans*.

Isto quer dizer que para ter maior longevidade nos organismos vivos deve existir um equilíbrio da doação de elétrons por parte dos fenólicos das nanoesferas a um nível quântico e que este equilíbrio deve estar relacionado com a estabilidade química, tamanho de partícula e energia livre. A morte prematura é o envelhecimento dos organismos acontece por causa da geração de espécies reativas de oxigênio pela mitocôndria (estresse oxidativo). Ou seja, o envelhecimento aparece à medida que o organismo vivo acumula lesões oxidativas. Para fundamentar isto, existe uma serie de mecanismos que tratam de explicar a longevidade, entre eles lesões na molécula de ADN, modificações na expressão genética, restrição calórica, estresse oxidativo nas mitocôndrias e encurtamento dos telômeros. O mecanismos do estresse oxidativo gera-se quando o O_2 molecular que é um bi radical e que após da adição seqüencial de quatro elétrons e prótons na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, gera água produzindo grande quantidade de energia celular adenosina trifosfato (ATP). Como pode gerar moléculas parcialmente reduzidas em um, dois e três elétrons, correspondem ao radical superóxido, H_2O_2 e radical hidroxilo, que são chamados espécies reativas de oxigênio (ROS) e causam dano oxidativo em macromoléculas celulares como lipídios, proteínas e DNA. Em *C. elegans*, elevadas concentrações de fenólicos e antioxidantes, poderiam estar apresentando este mecanismo como foi o caso da nanoesferas de T_2 , no entanto, as concentrações moderadas de antocianinas, fenólicos e flavonóides, pode estar levando a ter um equilíbrio de estresse oxidativo e pareamento de elétrons nas mitocôndrias, prolongando a supervivência dos organismos vivos neste caso dos *C. elegans* (HERRERO; BARJA, 2000).

4 CONCLUSÕES

Foram produzidas nanopartículas formuladas a partir de extratos de diferentes resíduos da vinificação, obtendo os maiores conteúdos de compostos fenólicos e atividade antioxidante as nanoesferas elaboradas com extrato de resíduos Shiraz e Merlot.

Determinou-se em função do tamanho de partículas, índice de polidispersão e potencial zeta, que as melhores tratamentos para serem consideradas como nanoesferas pertenceram as fórmulas elaboradas com extratos de resíduos Shiraz e Merlot, encapsuladas com maltodextrina DE15,5, com secagem por atomização.

Das características morfológicas, as nanopartículas produzidos por liofilização apresentaram formas irregulares e tamanho de partículas grandes, entretanto as produzidas por atomização foram de forma uniforme, esféricas e de tamanho muito pequeno.

Em relação à caracterização física, as nanoesferas T₂ e T₉, apresentaram baixa umidade e baixa atividade de água, portanto podem definir-se como encapsulações microbiologicamente estáveis. Além disso, tiveram boas características de solubilidade, higroscopicidade, molhabilidade e grau de aglomeração, devido ao efeito das boas condições do agente carreador e os parâmetros de encapsulamento.

A análise das transições térmicas, mostrou que o termograma das nanoesferas T₂ e T₉, apresentaram um valor de temperatura de transição vítrea (T_g) acima da temperatura ambiente. Além apresentaram um pico endotérmico com um ponto de fusão na faixa da presença de compostos fenólicos, fora disso as nanoesferas tiveram um valor de energia livre muito negativo, ideal para ser considerado nas ligações intracelulares e mitocondriais.

Durante a digestão gastrointestinal, a nanoesfera T₂ teve máxima liberação dos fenólicos e antioxidantes na fase da boca, mas ligera liberação no estômago e intestinos. O T₉ apresentou ligera liberação na boca e o estômago, mas teve maior quantidade de liberação no intestino delgado e grosso.

As nanoesfera T₂, formuladas com extrato de resíduo Shiraz aumentaram a produção de ROS, sinal de estresse oxidativo e tiveram valores de fluorescência por cima do controle, sendo os tempos de sobrevivência máxima menores que o controle.

As nanoesfera T₉, formuladas com extrato de resíduo Merlot apresentaram alta resistência a produção de ROS, o que é um sinal de estresse oxidativo, obtendo valores de fluorescência por baixo do controle, especialmente a concentração de 150 mg/mL. Além disso, essas nanoesferas aumentaram a longevidade no nematóide *C. elegans*, em particular o de 50 mg/mL que chegou a ter máxima supervivência de 37 dias, quando comparado com o controle que sobreviveu 27 dias (37.04% de aumento na longevidade).

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADHIKARI, B.; HOWES, T.; BHANDARI, B. R.; TROUNG, V. Effect of addition of maltodextrin on drying kinetics and stickiness of sugar and acid-rich during convective drying: Experiments and modelling. **Journal of Food Engineering**, v. 62, p. 53–68, 2004.

AGHBASHLO, M.; MOBLI, H.; MADADLOU, A.; RA FIEE, S. Fish oil microencapsulation as influenced by spray dryer operational variables. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 48, p. 1707 – 1713, 2013.

AHMED, J.; RAMASWAMY, H. S.; NGADI, M. O. Rheological characteristics of arabic gum in combination with guar and xanthan gum using response surface methodology: effect of temperature and concentration. **International Journal of Food Properties**, v. 8, p. 179-192, 2005.

AIZPURUA-OLAIZOLA, O.; NAVARRO, P.; VALLEJO, A.; OLIVARES, M.; ETXEBARRIA, N.; USOBIAGA, A. Microencapsulation and storage stability of polyphenols from *Vitis vinifera* grape wastes. **Journal Food Chemistry**, v. 190, p. 614-621, 2016.

ALSBERG, E.; KONG, H. J.; HIRANO, Y.; SMITH, M. K.; ALBEIRUTI, A.; MOONEY, D. J. Regulating bone formation via controlled scaffold degradation. **Journal of Dental Research**, v. 82, n. 11, p. 903–908, 2003.

AMELLER, T.; MARSAUD, V.; LEGRAND, P.; GREF, R.; BARRATT, G.; RENOIR, J. Polyester–Poly(Ethylene Glycol) Nanoparticles Loaded with the Pure Antiestrogen RU 58668: Physicochemical and Opsonization Properties. **Pharmaceutical Research**, v. 20, p. 1063-1070, 2003.

AMIGONI, L.; STUKNYTE, M.; CIARAMELLI, C.; MAGONI, C.; BRUNI, I.; NONI, I.; AIROLDI, C. REGONESI, M. E.; PALMIOLI, A. Green coffee extract enhances oxidative stress resistance and delays aging in *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Functional Foods**, v. 33, p. 297–306, 2017.

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis**. 16 ed. Washington DC, EUA, 2000.

ARVANITOYANNIS, I.; LADAS, D.; MAVROMATIS, A. Wine waste treatment methodology. **International Journal of Food Science & Tecnology**, v. 41, p. 1117-1151, 2006.

AVGOUSTAKIS, K.; BELETSI, A.; PANAGI, Z.; KLEPETSANIS, P.; KARYDAS, A.G.; ITHAKISSIOS, D.S. PLGA-mPEG nanoparticles of cisplatin: in vitro nanoparticle 190 degradation, in vitro drug release and in vivo drug residence in blood properties. **Journal of Controlled Release**, v. 79, p. 123-135, 2002.

AVILA, DS.; BENEDETTO, A.; AU, C.; MANARIN, F.; ERIKSON, K.; SOARES, F.A.; TEXEIRA, J.B.; ASCHNER, M. Organotellurium and organoselenium compounds attenuate

Mn-induced toxicity in *Caenorhabditis elegans* by preventing oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, n. 9, p. 1903–1910, 2012.

AZEREDO, H. M. C. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. Alimentos e Nutrição, **Araraquara**, v.16, n.1, p. 89-97, 2005.

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

BALANČ, B.; TRIFKOVIĆ K.; ĐORĐEVIĆ V.; MARKOVIĆ, S.; PJANOVIĆ, R.; NEDOVIĆ, V.; BUGARSKI, B. Novel resveratrol delivery systems based on alginate-sucrose and alginate-chitosan microbeads containing liposomes. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 832-842, 2016.

BARROS, F.A. R.; STRINGHETA, P. C. Microencapsulamento de antocianinas – uma alternativa para o aumento de sua aplicabilidade como ingrediente alimentício. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 36, p. 18-24, 2006.

BASTOS, D.; GONÇALVES, M.; TRISTÃO, C.; GOMES, K.; MIGUEZ, M. Microencapsulation of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) juice using a new chitosan–commercial bovine whey protein isolate system in spray drying. **Food and bioproducts processing**, v. 90, p. 683–692, 2012.

BAYDAR, N. G.; BABALIK, Z.; TÜRK, F. H.; ÇETIN E. S. Phenolic Composition and Antioxidant Activities of Wines and Extracts of Some Grape Varieties Grown in Turkey. **Journal of Agricultural Sciences**, v. 17, p. 67-76, 2011.

BETZ, M.; KULOZIK, U. Microencapsulation of bioactive bilberry anthocyanins by means of whey protein gels, **Science Direct - Procedia Food Science**, v. 1, p. 2046 – 2056, 2011.

BHUSARI, S. N.; MUZAFFAR, K.; KUMAR, P. Effect of carrier agents on physical and microstructural properties of spray dried tamarind pulp powder. **Powder Technology**, v. 266, p. 354–364, 2014.

BOONCHU, T. UTAMA-ANG, N. Optimization of extraction and microencapsulation of bioactive compounds from red grape (*Vitis vinifera* L.) pomace. **Journal Food Science Technology**, v. 52, n. 2, p. 783–792, 2015.

BUCIC-KOJIC, A.; PLANINIC, M.; TOMAS, S.; BILIC, M.; VELIC, D. Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grapes seeds. **Journal of Food Engineering**, v. 81, n. 1, p. 236-242, 2007.

CANO-CHAUCA, M.; STRINGHETA, P.C.; RAMOS, A.M.; CAL-VIDAL, C. Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 6, p. 420–428, 2005.

CARBONARO, M.; GRANT, G.; CAPPELLONI, M.; PUSZTAI, A. Perspectives into factors limiting in vivo digestion of legume proteins: Antinutritional compounds or storage proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, p. 742-749, 2000.

CARNEIRO, H. C. F.; TONON, R.V.; GROSSO, C.R.F.; HUBINGER, M.D. Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials. **Journal of Food Engineering**, v. 115, p. 443–451, 2013.

CHARÃO, MF.; SOUTO, C.; BRUCKER, N.; BARTH, A.; JORNADA, DS.; FAGUNDEZ, D.; ÁVILA, DS.; EIFLER-LIMA, VL.; GUTERRES, SS.; POHLMANN, AR.; GARCIA, SC. *Caenorhabditis elegans* as an alternative in vivo model to determine oral uptake, nanotoxicity, and efficacy of melatonin-loaded lipid-core nanocapsules on paraquat damage, **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 5093–5106, 2015.

CHARLTON, A.; BAXTER, N.; KHAN, L.; MOIR, A.; HASLAM, E.; DAVIES, A.; WILLIAMSON, M. Polyphenol/peptide binding and precipitation. **J Agric Food Chem**, v. 50, p. 1593-1601, 2002.

CHEN, W.; MÜLLER, D.; RICHLING, E.; WINK, M. Anthocyanin-rich Purple Wheat Prolongs the Life Span of *Caenorhabditis elegans* Probably by Activating the DAF-16/FOXO Transcription Factor. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 3047–3053, 2013b.

CHEN, Q.; ZHONG, F.; WEN, J.; MCGILLIVRAY, D.; QUEK, S. Y. Properties and stability of spray-dried and freeze-dried microcapsules co-encapsulated with fish oil, phytosterol esters, and limonene. **Dry Technology**, v. 31, p. 707 –716, 2013a.

DAVIDOV-PARDO G., AROZARENA I., MARÍN-ARROYO, M. Optimization of a Wall Material Formulation to Microencapsulate a Grape Seed Extract Using a Mixture Design of Experiments. **Food Bioprocess Technol**, v. 6, p. 941–951, 2013.

DAVIDOV-PARDO, G.; MCCLEMENTS, D. Nutraceutical delivery systems: Resveratrol encapsulation in grape seed oil nanoemulsions formed by spontaneous emulsification. **Food Chemistry**, v. 167, p. 205–212, 2015.

DAZA, L.D.; FUJITA, A.; FÁVARO-TRINDADE, C.S.; RODRIGUES-RACT, J.N.; GRANATO, D.; GENOVESE, M. I. Effect of spray drying conditions on the physical properties of Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) fruit extracts. **Food and Bioprocess Processing**, v. 97, p. 20-29, 2016.

DE BARROS FERNANDES, R. V.; MARQUES, G. R.; BORGES, S. V.; BOTREL, D. A. Effect of solids content and oil load on the microencapsulation process of rosemary essential oil. **Industrial Crops and Products**, v. 58, p. 173 –181, 2014.

DESCAMPS, N.; PALZER, S.; ZUERCHER, U. The amorphous state of spray-dried maltodextrin: sub-sub-Tg enthalpy relaxation and impact of temperature and water annealing. **Carbohydr. Res.**, v. 344, p. 85–90, 2009.

- DUTRA, I.; ABREU, M.; PAES, I. Comparison between the spray drying and spray chilling microparticles contain ascorbic acid in a baked product application. **Food Science and Technology**, v. 65, p. 689-694, 2016.
- ERSUS, S.; YURDAGEL, U. Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* L.) by spray dryer. **Journal of Food Engineering**, v. 80, p. 805–812, 2007.
- ESTEVINHO, B. N.; ROCHA, F.; SANTOS, L.; ALVES, A. Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications – A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 31, n. 2, p. 138–155, 2013.
- FABRA, M.J.; TALENS, P.; MORAGA, G.; MARTINEZ-NAVARRETE, N. Sorption isotherms and state diagrams of grapefruit as tool to improve product processing and stability. **Journal of Food Engineering**, v. 93, p. 52-58, 2009.
- FANG, Z.; BHANDARI, B. Effect of spray drying and storage on the stability of bayberry polyphenols. **Food Chemistry**, v. 129, p. 1139–1147, 2011.
- FANGA, Z.; BHANDARIA, B. Encapsulation of polyphenols a review.. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, p. 510-523, 2010.
- FATHI, M.; VARSHOSAZ, J.; MOHEBBI, M.; SHAHIDI, F. Hesperetin-Loaded Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructure Lipid Carriers for Food Fortification: Preparation, Characterization, and Modeling. **Food Bioprocess Technology**, v. 6, p. 1464 - 1475, 2013.
- FERNANDES, R. V. B.; BORGES, S. V.; BOTREL, D. A. Gum arabic/starch/maltodextrin/inulin as wall materials on the microencapsulation of Rosemary essential oil. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 524–532, 2014.
- FERRARI, C. C.; GERMER, S. P. M.; ALVIM, I. D.; VISSOTTO, F. Z.; AGUIRRE, J. M. Influence of carrier agents on the physicochemical properties of blackberry powder produced by spray drying. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 47, p. 1237–1245, 2012.
- FERRARI, C. C.; MARCONI, G. P.; ALVIM, I. D.; DE AGUIRRE, J. M. Storage stability of spray-dried blackberry powder produced with maltodextrin or gum arabic. **Drying Technology**, v. 31, p. 470-478, 2013.
- FERREIRA, I.; BAPTISTA, P.; VILAS-BOAS, M.; BARROS, L. Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1511-1516, 2007.
- FERRI, M.; TASSONI, A.; FRANCESCHETTI, M.; RIGHETTI, L.; NALDRETT, M.; BAGNI, N. Chitosan treatment induces changes of protein expression profile and stilbene distribution in *Vitis Vinifera* cell suspensions. **Proteomics**, v. 9, p. 610-624, 2009.
- FONTANA, A. R.; ANTONIOLLI, A.; BOTTINI, R. Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: extraction, characterization, and biotechnological applications of phenolics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 8987–9003, 2013.

GAMI, M. S.; WOLKOW, C. A. Studies of *Caenorhabditis elegans* DAF-2/insulin signaling reveal targets for pharmacological manipulation of lifespan. **Aging Cell**, v. 5, n. 1, p. 31-37, 2006.

GATTO, P.; VROVSEK, U.; MUTH, J.; SEGALA, C.; ROMUALDI, C.; FONTANA, P.; PRUEFER, D.; STEFANINI, M.; MOSER, C.; MATTIVI, F.; VELASCO, R. Ripening and genotype control stilbene accumulation in healthy grapes. **J. Agric. Food Chem**, v. 56, p. 11773-11785, 2008.

GHOSAL, S.; INDIRA, T. N.; BHATTACHARYA, S. Agglomeration of a model food powder: Effect of maltodextrin and gum Arabic dispersions on flow behavior and compacted mass. **Journal of Food Engineering**, v. 96, p. 222-228, 2010.

GIBIS, M.; VOGTA, E.; WEISS, J. Encapsulation of polyphenolic grape seed extract in polymer-coated liposomes. **Food Funct**, v. 3, p. 246-254, 2012.

GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Anthocyanins, Characterization and Measurement with UV-Visible Spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, v. 2, p. 1-13. 2001.

GOMEZ-PLAZA, E.; MINANO, A.; LOPÉZ-ROCA, J. M. Comparison of chromatic properties, stability and antioxidant capacity of anthocyanin-based aqueous extracts from grape pomace obtained from different vinification methods. **Food Chemistry**, v. 97, n.1, p. 87-94, 2006.

GOULA, A. ADAMOPOULOS, K. Effect of maltodextrina addition during spray dryin of tomato pulp in dehumified air: I. Drying kinetics and recovery. **Dry Technol**, v. 26, n.6, p. 714-725, 2008.

GU, Q.; ZOU, A.; YUAN, C.; GUO, R. Effects of a bolaamphiphile on the structure of phosphatidylcholine liposomes. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 266, p. 442-447, 2003.

GUERRA, A.; ETIENNE-MESMIN, L.; LIVRELLI, V.; DENIS, S.; BLANQUET-DIOT, S.; ALRIC, M. Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 11, p. 591-600, 2012.

HERRERO, A.; BARJA, G. Localization of the Site of Oxygen Radical Generation inside the Complex I of Heart and Nonsynaptic Brain Mammalian Mitochondria. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 32, p. 609-615, 2000.

HEURTAULT, B.; SAULNIER, P.; PECH, B.; PROUST, J.E.; BENOIT, J.P. Physicochemical stability of colloidal lipid particles. **Biomaterials**, v. 24, p. 4283-4300, 2003.

HUNG, LH; HORAGAI, Y; KIMURA, Y; ADACHI, S.. Decomposition and discoloration of L-ascorbic acid freeze-dried with saccharides. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**. v. 8, n. 4, p. 500-506, 2007.

- HUSSAIN, N.; JAITLEY, V.; FLORENCE, A. T. Recent advances in the understanding of uptake of microparticulates across the gastrointestinal lymphatics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 50, p. 107-142, 2001.
- JAYA, S.; DAS, H. Effect of maltodextrin, glycerol monostearate and tricalcium phosphate on vacuum dried mango powder properties. **Journal of Food Engineering**, v. 63, p. 125-134, 2004.
- JINAPONG, N.; SUPHANTHARIKA, M.; JAMNONG, P. Production of instant soymilk powders by ultrafiltration, spray drying and fluidized bed agglomeration. **Journal of Food Engineering**, v. 84, n. 2, p. 194-205, 2008.
- JYOTHI, N. V. N.; PRASANNA, M. P.; SAKARKAR, N. S.; PRABHA, S. K.; RAMAIAH, S. P.; SRAWAN, G. Y. Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. **Journal of Microencapsulation**, v. 27, n. 3, p. 187 -197, 2010.
- KALETTA, T.; HENGARTNER, M. O. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. **Nat Rev Drug Discov**, v. 5, n. 5, p. 387-398, 2006.
- KOGA, CC.; ANDRADE, JE.; FERRUZZI, MG.; LEE, Y. Stability of *Trans*-Resveratrol encapsulated in a Protein Matrix Produced Using Spray Drying to UV Light Stress and Simulated Gastro-Intestinal Digestion. **Journal of Food Science**, v. 81, n. 2, p. 292-300, 2016.
- KOSARAJU, S. L.; LABBETT, D.; EMIN, M.; KONCZAK, I.; LUNDIN, L. Delivering polyphenols for healthy ageing. **Nutrition & Dietetics**, v. 65, p. S48 - S52, 2008.
- KUBOTA, M.; SAITO, Y.; MASUMURA, T.; KUMAGAI, T.; WATANABE, R.; FUJIMURA, S.; KADOWAKI, M. Improvement in the *In vivo* digestibility of Rice protein by alkali extration is due to structural changes in prolamin/protein body-I particles. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 74, n. 3, p. 614-619, 2010.
- KUCK, L.S. E.; NOREÑA, C.P.Z. Microencapsulation of grape (*Vitis labrusca* var. Bordo) skin phenolic extract using gum Arabic, polydextrose, and partially hydrolyzed guar gum as encapsulating agents. **Food Chemistry**, v. 194, p. 569–576, 2016.
- KUMAR, N.; RAVIKUMAR, M. N. V.; DOMB, A. J. Biodegradable block copolymers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 53, p. 23-44, 2001.
- LI, F.; WENG, Y.; WANG, L.; HE, H.; YANG, J.; TANG, X. The efficacy and safety of bufadienolides-loaded nanostructured lipid carriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 393, p. 203-2011, 2010.
- LIMA, M. E.; COLPO, A. C.; SALGUEIRO, W. G.; SARDINHA, G. E.; ÁVILA, D. S.; FOLMER, V. *Ilex paraguariensis* Extract Increases Lifespan and Protects Against the Toxic Effects Caused by Paraquat in *Caenorhabditis elegans*. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 11, p. 10091-10104, 2014.

MACEDO, L. F.; ROGERO, M.; GUIMARAES, J.; GRANATO, D.; LOBATO, L.; CASTRO, I. A. Effect of red wines with different in vitro antioxidant activity on oxidative stress of high-fat diet rats. **Food Chemistry**, v. 137, n. 1, p. 122-129, 2013.

MACHADO, A.R.; ASSIS, L.M.; MACHADO M.I.R.; SOUZA-SOARES, L.A. Importance of lecithin for encapsulation processes. **African Journal Food Science**, v. 8, n. 4, p. 176-183, 2014.

MADENE, A.; JACQUOT, M.; SCHER, J.; & DESOBRY, S. Flavour encapsulation and controlled release – a review. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 41, n. 1, p. 1-21, 2006.

MAHDAVI, A. A.; JAFARI, S. M.; DPOOR, E. A.; DEHNAD, D. Microencapsulation optimization of natural anthocyanins with maltodextrin, gum Arabic and gelatin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 85, p. 379–385, 2016.

MALATAINS, A.; JONES, O. G.; MCCLEMENTS, D. J. Structured biopolymerbased delivery systems for encapsulation, protection, and release of lipophilic compounds. **Food Hydrocolloids**, v.25, n.8, p.1865-1880, 2011.

MARTINELLI, L.; GABAS, A. L.; TELIS-ROMERO, J. T. Thermodynamic and quality properties of lemon juice powder as affected by maltodextrin and arabic gum. **Drying Technology**, v. 25, p. 2035-2045, 2007.

MCRAE, J. M.; KENNEDY, J.A. Wine and grape tannin interaction with salivary proteins and their impact on astringency: a review of current research. **Molecules**, v. 16, p. 2348-2364, 2011.

MENG, G. T.; MA, C. Y. Thermal properties of *Phaseolus angularis* (Red bean) globulin. **Food Chemistry**, v. 23, n. 4, p. 453–460, 2001.

MOSER, P.; SOUZA, R.; NICOLETTI, N.. Spray drying of grape juice from hybrid cv. brs violeta: microencapsulation of anthocyanins using protein/maltodextrin blends as drying Aids. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 41, p. 1-11, 2016.

MULLER, F. L.; LIU, Y.; ABDUL-GHANI, M. A.; LUSTGARTEN, M. S.; BHATTACHARYA, A. Suppression by flavonoids of cyclooxygenase-2 promoterdependent transcriptional activity in colon cancer cells: Structure-activity relationship. **Jpn J. Cancer Res**, v. 91, p. 686-691, 2000.

NENADIS, N.; WANG, L. F.; TSIMIDOU, M.; ZHANG, H. Y. Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS^{•+} assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 4669-4674, 2004.

NIJDAM, J.J.; LANGRISH, T.A.G.; The effect of surface composition on the functional properties of milk powders. **Journal of Food Engineering**, v. 77, p. 919-952, 2006.

OURIQUE, A. F.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BECKD, R. C. R. Tretinoin-loaded nanocapsules: Preparation, physicochemical characterization, and photostability study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 352, p. 1-4, 2008.

PHISUT, N. Spray drying technique of fruit juice powder: some factors influencing the properties of product. **International Food Research Journal**, v. 19, n. 4, p. 1297-1306, 2012.

PINHEIRO, A.C.; LAD, M.; SILVA, H.D.; COIMBRA, M.A.; BOLAND, M.; VICENTE, A.A. Unravelling the behavior os curcumin nanoemulsions during in vitro digestion:effect of the surface charge. **Soft Matter**, v. 9, n. 11, p. 3147-3154, 2013.

PORRARUD, S.; PRANEE, A. Microencapsulation of Zn-chlorophyll pigment from Pandan leaf by spray drying and its characteristic. **International Food Research Journal**, v. 17, p. 1031-1042, 2010.

POURASHOURI, P.; SHABANPOUR, B.; RAZAVI, S.H.; JAFARI, S.M.; SHABANI, A.; AUBOURG, S.P. 2014. Impact of wall materials on physicochemical properties of microencapsulated fish oil by spray drying, **Food Bioprocess Technology**, v. 7, n. 8, p. 2354-2365, 2014.

QUEK, S. Y.; CHOK, N. K.; SWEDLUND, P. The physicochemical properties of spray-dried watermelon powders. **Chemical Engineering and Processing**, v. 46, p. 386–392, 2007

RATHORE, S.; DESAI, P. M.; LIEW, C. V.; CHAN, L. W.; HENG, P. W. S. Review- Microencapsulation of microbial cells. **Journal of food engineering**, v. 116, n. 2, p. 369-381, 2013.

REIS, P.; RAAB, T.; CHUAT, J.; LESER, M.; MILLER, R.; WATZKE, H., Influence of surfactants on lipase fat digestion in a model gastro-intestinal system. **Food Biophysics**, v. 3, n. 4, p. 370-381, 2008.

RIGHETTO, A. M.; NETTO, F. M. Effect of encapsulating materials on water sorption, glass, transition and stability of juice from immature acerola. **International Journal of Food Properties**, v. 8, p. 337-346, 2005.

ROCHA, G. A.; FÁVARO-TRINDADE, C. S.; GROSSO, C. R. F. Microencapsulation of lycopene by spray drying: Characterization, stability and application of microcapsules. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, p. 37-42, 2012.

ROCHA-PARRA, D.F.; LANARI, M.C.; ZAMORA, M.C.; CHIRIFE, J. Inflence of storage conditions on phenolic compounds stability, antioxidant capacity and colour of freeze-dried encapsulated red wine. **LWT - Food Science and Technology**, v. 70, p. 162-170, 2016.

RODRÍGUEZ, J.; MARTÍN, M. J.; RUIZ, M. A.; CLARES, B. Current encapsulation strategies for bioactive oils: From alimentary to pharmaceutical perspectives. **Food Research International**, v. 83, p. 41 – 59, 2016.

ROMERO-PEREZ, A.; LAMUELA-RAVENTOS, R.; ANDRE-LACUEVA, C.; DE LA TORRE-BORONAT, C. Method for the quantitative extraction of resveratrol and piceid isomers in grape Berry skins. Effect of powdery mildew on the stilbene content. **J. Agric. Food chemistry**, v. 49, p. 210-215, 2001.

ROSSETTI, D.; YAKUBOV, G. E.; STOKES, J. R.; WILLIAMSON, A. M.; FULLER, G. G. Interaction of human whole saliva and astringent dietary compounds investigated by interfacial shear rheology. **Food Hydrocolloids**, v. 22, P. 1068-1078, 2008.

SALAWU, S. O.; AJIBOYE, P. B.; AKINDAHUNSI, A. A.; BOLIGON, A. A. Antioxidant and Anticholinesterase Potential of Two Nigerian Bitter Yams Using a Simulated Gastrointestinal Digestion Model and Conventional Extraction, **Prev. Nutr. Food Sci.** v. 22, n. 2, p. 107-117, 2017

SANTANA, A. A.; PEREIRA, L. G.; OLIVEIRA, R. A.; KUROZAWA, L. E.; PARK, K. J. Spray Drying of Babassu Coconut Milk Using Different Carrier Agents. **Journal Drying Technology, An International Journal**, v. 35, n. 1, p. 76-87. 2017.

SCHMITZ-SCHUG, I.; KULOZIK, U.; FOERST, P. Modeling spray drying of dairy products- Impact of drying kinetics, reaction kinetics and spray drying conditions on lysine loss. **Chemical Engineering Science**, v. 141, p. 315 –329, 2016.

SCHROOYEN, P. M. M.; VAN DER MEER, R.; DE KRUIF, C. G. Microencapsulation: its application in nutrition. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 60, p. 475-479, 2001.

SESSA, M.; TSAO, R.; LIU, R.; FERRARI, G.; DONSI, F. Evaluation of the stability and antioxidant activity of nanoencapsulated resveratrol during *in vitro* digestion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 12352- 12360, 2011.

SHARMA, A.; JANA, A.H.; CHAVAN, R.S. Functionality of Milk Powders and Milk-Based Powders for End Use Applications - A Review. **Journal Food Science e Food Safety**, v. 11, n. 5, p. 518–528, 2012.

SHOFINITA, D.; LANGRISH, T. A. G. Spray drying of orange peel extracts: Yield, total phenolic content, and economic evaluation. **Journal of Food Engineering**, v. 139, p. 31–42, 2014.

SHRESTHA, AK; UA-ARAK, T; ADHIKARI, BP; BHANDARI, BR. Glass transition behavior of spray dried Orange juice powder measured by differential scanning calorimetry (dsc) and thermal mechanical compression test (TMCT), **International Journal of Food Properties**, v. 10, p. 661–673, 2007

SILVA, V.; GENTA, G.; MÖLLER, M.; MASNER, M.; THOMSON, L.; ROMERO, N.; RADI, R.; FERNANDES, D.; LAURINDO, F.; HEINZEN, H.; FIERRO, W.; DENICOLA, A. Antioxidant activity of uruguayan propolis. In vitro and cellular assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 12, p. 6430-7, 2011.

SINGH, M. N.; HEMANT, K. S. Y.; RAM, M.; SHIVAKUMAR, H. G. Microencapsulation: A promising technique for controlled drug delivery. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 5, p. 65 –77, 2014.

SOARES, A. P.; KIMI, U, S.; NOGUERIA, N.J. F.; ROSA, G. Hypocaloric diet associated with the consumption of jam enriched with microencapsulated fish oil decreases insulin resistance. **Nutrición Hospitalaria**, v. 29, p. 1103 –1108, 2014.

SOLIS, G. M.; PETRASCHECK, M.. Measuring *Caenorhabditis elegans* life span in 96 well microtiter plates, **Journal of Visualized Experiments: JovE**, v. 49, p. 1-6, 2011

SOUZA, V. B.; FUJITA, A.; THOMAZINI, M.; DA SILVA, E. R.; LUCON, J. F.; GENOVESE, M. I.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Functional properties and stability of spray-dried pigments from Bordo grape (*Vitis labrusca*) winemaking pomace. **Food Chemistry**, v. 164, p. 380–386, 2014.

SOUZA, V. B.; THOMAZINI, M.; BALIEIRO, J. C. C.; FÁVARO-TRINDADE, C. S. Effect of spray drying on the physicochemical properties and color stability of the powdered pigment obtained from vinification byproducts of the Bordo grape (*Vitis labrusca*). **Food and Bioproducts Processing**, v. 93, p. 39–50, 2015.

STOLL, L.; COSTA, T. M.; JABLONSKI, A.; HICKMANN, S.; RIOS, A. Microencapsulation of Anthocyanins with Different Wall Materials and Its Application in Active Biodegradable Films. **Food and Bioprocess Technology**, v. 9, n. 1, p. 172–181, 2016.

SURVESWARAN, S.; CAI, Y. Z.; CORKE, H.; SUN, M. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. **Food Chemistry**, v. 102, n. 3, p. 938-953, 2007.

TAMJIDI, F.; SHAHEDI, M.; VARSHOSAZ, J.; NASIRPOUR, A. Nanostructured lipid carriers (NLC): A potential delivery system for bioactive food molecules. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 19, p. 29–43, 2013.

TELIS, V.R.N; MARTINEZ-NAVARRETE, N. Collapse and color changes in grapefruit juice powder as affected by water activity, glass transition and addition of carbohydrate polymers. **Food Biophysics**, v. 43, p. 44 -751, 2009.

TOLUN, A; ALTINTAS, Z.; ARTIK, N. Microencapsulation of grape polyphenols using maltodextrin and gum arabic as two alternative coating materials: Development and characterization. **Journal of Trends in Food Science & Technology**, v. 63, p. 91-102, 2017.

TONON, R. V.; BRABET, C.; HUBINGER, M. D. Anthocyanin stability and antioxidant activity of Spray-dried açai (*Euterpe oleracea Mart.*) juice produced with different carrier agents. **Food Research International**, v. 43, n. 3, p. 907–914, 2010.

TSENG, A.; ZHAO, Y. Wine grape pomace as antioxidant dietary fibre for enhancing nutritional value and improving storability of yogurt and salad dressing. **Food Chemistry**, v. 138, p. 356–365, 2013.

VILLANOVA, J. C. O.; ORÉFICE, R. L.; CUNHA, A. S. Aplicações farmacêuticas de polímeros. **Polímeros**, v. 20, n. 1, p. 51-64, 2010.

VILLELA-CASTREJON, J.; ACOSTA-ESTRADA, BA; GUTIERREZ-URIBE JA. Microencapsulation of Corn Wastewater (Nejayote) Phytochemicals by Spray Drying and Their Release Under Simulated Gastrointestinal Digestion. **Journal Food Science**, v. 82, n. 7, p. 1726-1734, 2017.

VITRAC, X.; BORNET, A.; VANDERLINDE, R.; VALLS, J.; RICHARD, T.; DELAUNAY, J.; MERILLON, J.; TEISSEDER, P. Determination of stilbenes (δ -viniferin, *trans*-astringin, *trans*-piceid, *cis* and *trans*-resveratrol, ϵ -viniferin) in Brazilian wines. **J. Agric. Food Chemistry**, v. 53, p. 5664-5669, 2005.

URANO, F.; CALFON, M.; YONEDA, T.; YUN, C.; KIRALY, M.; CLARK, S. G.; RON, D. A survival pathway for *Caenorhabditis elegans* with a blocked unfolded protein response. **J. Cell Biol.**, v. 158, p. 639-646, 2002.

WANG, S.; AMIGO-BENAVENT, M.; MATEOS, R.; BRAVO, L.; SARRIÁ, B. Effects of in vitro digestion and storage on the phenolic content and antioxidant capacity of a red grape pomace. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 68, n. 2, p. 188-200, 2016.

XIANG, L.; XIAO, L.; WANG, Y.; LI, H.; HUANG, Z.; HE, X. Health benefits of wine: don't expect resveratrol too much. **Food Chemistry**, v.156, n. 1, p. 2582-63, 2014.

YANG, J.; MARTINSON, T.; LIU, R. Phytochemical profiles and antioxidant activities of wine grapes. **Food Chemistry**, v.116, p.332-339, 2009.

YOUSEFI, S.; EMAM-DJOMEH, Z.; MOUSAVI, S. Effect of carrier type and spray drying on the physicochemical properties of powdered and reconstituted pomegranate juice (*Punica Granatum* L.). **Journal of food science and technology**, v. 48, n. 6, p. 677-684, 2011.

YOU-TUNG, L.; CHENG-CHENG, P.; SHWU-TZY, W.; CHI-YUE, C. Effect of Different Germination Conditions on Antioxidative Properties and Bioactive Compounds of Germinated Brown Rice. **Journal Bio Med Research International**, v. 2015, p. 1-10, 2015.

CAPÍTULO IV – CONCLUSÕES

4.1 CONCLUSÕES PARCIAIS

Da caracterização dos resíduos de uva procedentes da vinificação apresentou valores físico-químicos favoráveis para sua estabilidade como substrato ideal para sua conservação e uso no processo industrial. Da composição química centesimal, fenólica e antioxidante, o resíduo Merlot foi o que apresentou o conteúdo mais baixo de valor energético, valores mais altos em antocianinas, flavonoides totais e fenólicos totais. Estes resultados tiveram uma relação direta sobre métodos de sequestro de radicais livres ABTS e DPPH, onde o resíduo de uva da variedade Merlot apresentou os valores mais altos de atividade antioxidante e do poder redutor como um indicativo de sua alta atividade antioxidante.

Em relação à extracção sólido-líquido dos compostos fenólicos, o melhor tratamento foi o que utilizou metanol acidificado (98%; pH 1,5; 24 horas) devido a sua alta polaridade química entre o solvente e os princípios ativos dos resíduos da vinificação. O extrato da variedade Merlot reportaram maior conteúdo de antocianinas, característica demonstrada pelos ótimos parâmetros cromáticos de cor, onde este resíduo teve uma alta tonalidade de cor vermelha. Porém o conteúdo de flavonoides totais e *trans*-resveratrol foi maior no extrato do resíduo Shiraz. Portanto o alto valor de atividade antioxidante no extrato Merlot foi consequência da alta presença de antocianinas e o alto valor de atividade antioxidante no extrato Shiraz foi devido a alta presença de flavonóides totais e *trans*-resveratrol, responsáveis da boa capacidade de sequestrar radicais livres ABTS e DPPH. Esses resultados confirmam que os extratos dos resíduos Merlot e Shiraz, podem ser considerados como boas fontes naturais de fenólicos, flavonóides totais, resveratrol e de alta capacidade antioxidante.

Das nanocápsulas formuladas a partir dos extratos de resíduos da vinificação, os maiores valores de antocianinas, fenólicos, flavonóides totais e atividade antioxidante, foram das nanocápsulas identificadas como T₂ e T₉. Além disso, se determinou que eles apresentaram boa estabilidade e que pertenceram as formulas conformados com extratos de resíduos da variedade Shiraz encapsuladas com maltodextrina DE15,5 por Spray dryer (T₂) e os resíduos da variedade Merlot encapsuladas com maltodextrina DE15,5 por Spray dryer (T₉). Em relação à caracterização física das nanocápsulas T₂ e T₉, apresentaram boas características de solubilidade, higroscopicidade, molhabilidade e grau de aglomeração, devido ao efeito das boas especificações do agente carreador e os parâmetros de encapsulamento. A temperatura de transição vítrea (T_g) indicou que as nanocápsulas T₂ e T₉

apresentaram boa estabilidade e que podem ser armazenadas a cima da temperatura ambiente. O termograma das nanocápsulas apresentaram um pico endotérmico com um ponto de fusão que ficou na faixa da presença de compostos fenólicos, fora disso as nanocápsulas tiveram um valor de energia livre negativo, ideal para ser considerados nas ligações intracelulares e mitocondriais.

Durante a digestão gastrointestinal o encapsulado T₂ teve maxima liberação dos fenólicos e antioxidantes na fase da boca, menor liberação no estomago e intestinos. O T₉ apresentou menor liberação na boca e o estomago, mas apresentou maior quantidade de liberação nos intestinos delgado e grosso.

Durante a avaliação do estresse oxidativo *in vivo* sobre os nematóides *C. elegans*, demonstrou-se que as nanocápsulas de resíduos de Shiraz aumentaram a produção de ROS por cima do controle e os tempos de sobrevivência máxima foram menores que o controle. Porém as nanocápsulas de resíduos de Merlot tiveram alta resistência à produção de ROS sinal de estresse oxidativo e apresentaram valores de fluorescência por baixo do controle, especialmente a concentração de 150 mg/mL. Além disso, essas nanocápsulas aumentam a longevidade em nematóide *C. elegans*, em particular o de 50 mg/mL que chegou a ter máxima sobrevivência de 37 dias, maior que o controle de 27 dias (37.04% de aumento).

4.2 CONCLUSÃO GERAL

Extraíu-se os compostos fenólicos dos resíduos da vinificação que apresentaram boas características antioxidantes e que permitiram produzir nanocápsulas de extratos de resíduos Shiraz e Merlot, que mostraram boas características físicas, químicas, fenolicas e de atividade antioxidante. Quando avaliadas pela digestão gastrointestinal “*in vitro*” mostraram capacidade de liberação de compostos fenólicos com atividade antioxidante. Quando avaliadas biologicamente produziram efeitos positivos na longevidade e negativos no estresse oxidativo dos vermes de *C. elegans*.

CAPÍTULO V - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G.; FESSI, H. Investigation of nanocapsules stabilization by amorphous excipients during freeze-drying and storage. **Eur J. Pharm Biopharm**, v. 63, n. 2, p. 87-94, 2006.

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.

ADHIKARI, B.; HOWES, T.; BHANDARI, B. R.; TROUNG, V. Effect of addition of maltodextrin on drying kinetics and stickiness of sugar and acid-rich during convective drying: Experiments and modelling. **Journal of Food Engineering**, v. 62, p. 53–68, 2004.

AGHBASHLO, M.; MOBLI, H.; MADADLOU, A.; RA FIEE, S. Fish oil microencapsulation as influenced by spray dryer operational variables. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 48, p. 1707 – 1713, 2013.

AGUIL, M. T. **Caracterização físico-química, química e sensorial de frutos e vinhos da cv Patrícia (*Vitis labrusca* L.)**. 2005. 80f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos)-Universidade federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil, 2005.

AHMAD, S. F.; ZOHEIR, K. M. A.; ABDEL-HAMIED, H. E.; ASHOUR, A. E.; BAKHEET, S. A.; ATTIA, S. M.; ABD-ALLAH, A. R. A. Grape seed proanthocyanidin extract has potent anti-arthritic effects on collageninduced arthritis by modifying the T cell balance. **International Immunopharmacology**, v. 17, p. 79–87, 2013.

AHMED, J.; RAMASWAMY, H. S.; NGADI, M. O. Rheological characteristics of arabic gum in combination with guar and xanthan gum using response surface methodology: effect of temperature and concentration. **International Journal of Food Properties**, v. 8, p. 179-192, 2005.

AIZPURUA-OLAIZOLA, O.; NAVARRO, P.; VALLEJO, A.; OLIVARES, M.; ETXEBARRIA, N.; USOBIAGA, A. Microencapsulation and storage stability of polyphenols from *Vitis vinifera* grape wastes. **Journal Food Chemistry**, v. 190, p. 614-621, 2016.

ALASALVAR, C. E.; GRIGOR, J. M.; ZHANG, D.; QUANTICK, P. C.; SHAHIDI, F. Comparison of volatiles, phenolics, sugars, antioxidant vitamins, and sensory quality of different colored carrot varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p. 1410–1416, 2001.

ALSBERG, E.; KONG, H. J.; HIRANO, Y.; SMITH, M. K.; ALBEIRUTI, A.; MOONEY, D. J. Regulating bone formation via controlled scaffold degradation. **Journal of Dental Research**, v. 82, n. 11, p. 903–908, 2003.

AMELLER, T.; MARSAUD, V.; LEGRAND, P.; GREF, R.; BARRATT, G.; RENOIR, J. Polyester–Poly(Ethylene Glycol) Nanoparticles Loaded with the Pure Antiestrogen RU 58668: Physicochemical and Opsonization Properties. **Pharmaceutical Research**, v. 20, p. 1063-1070, 2003.

- AMICO, V.; CHILLEMI, R.; MANGIAFICO, S.; SPATAFORA, C.; TRINGALI, C.; Polyphenol-enriched fractions from Sicilian grape pomace: HPLC-DAD analysis and antioxidant activity. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 5960-5966, 2008.
- AMIGONI, L.; STUKNYTE, M.; CIARAMELLI, C.; MAGONI, C.; BRUNI, I.; NONI, I.; AIROLDI, C. REGONESI, M. E.; PALMIOLI, A. Green coffee extract enhances oxidative stress resistance and delays aging in *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Functional Foods**, v. 33, p. 297–306, 2017.
- ANASTASIADI, M.; PRATSINIS, H.; KLETSAS, D.; SKALTSOUNIS, A. L.; HAROUTOUNIAN, A. Grape stem extracts: Polyphenolic content and assessment of their *in vitro* antioxidant properties. **Food Science and Technology**, v. 48, p. 316–322, 2012.
- ANASTASIADI, M.; PRATSINIS, H.; KLETSAS, D.; SKALTSOUNIS, A.; HAROUTOUNIAN, S. Bioactive non-coloured polyphenols content of grapes, wines and vinification by-products: Evaluation of the antioxidant activities of their extracts. **Food Research International**, v. 43, p. 805-813, 2010.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis**. 16 ed. Washington DC, EUA, 2000.
- APOSTOLOU, A.; STAGOS, D.; GALITSIOU, E.; SPYROU, A.; HAROUTOUNIAN, S.; PORTESIS, N.; TRIZOGLOU, I.; HAYES, A. W.; TSATSAKIS, A. M.; KOURETAS, D. Assessment of polyphenolic content, antioxidant activity, protection against ROS-induced DNA damage and anticancer activity of *Vitis vinifera* stem extracts. **Food and Chemical Toxicology**, v. 61, p. 60–68, 2013.
- ARORA, S.; RAJWADE, J. M.; PAKNIKAR, K. M. Nanotoxicology and in vitro studies: the need of the hour. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 258, n. 2, p. 151-165, 2012.
- ARTAL-SANZ, M.; DE JONG, L.; TAVERNARAKIS, N. *Caenorhabditis elegans*: a versatile platform for drug discovery. **Journal Biotechnology**, v. 1, p. 1405–1418, 2006.
- ARVANITOYANNIS, I.; LADAS, D.; MAVROMATIS, A. Wine waste treatment methodology. **International Journal of Food Science & Tecnology**. v. 41, p. 1117-1151, 2006.
- ATANACKOVIĆ, M.; PETROVIĆ, A.; JOVIĆ, S.; GOJKOVIĆ-BUKARICA, L.; BURSÁC, M.; CVEJÍČ, J. Influence of winemaking techniques on the resveratrol content, total phenolic content and antioxidant potential of red wines. **Food Chemistry**, v. 131, p. 513-518, 2012.
- AUGUSTIN, M. A.; HEMAR, Y. Nano- and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. **Chemical Society Reviews**, London, v. 38, p. 902–912, 2009.
- AVGOUSTAKIS, K.; BELETSI, A.; PANAGI, Z.; KLEPETSANIS, P.; KARYDAS, A.G.; ITHAKISSIOS, D.S. PLGA-mPEG nanoparticles of cisplatin: in vitro nanoparticle 190 degradation, in vitro drug release and in vivo drug residence in blood properties. **Journal of Controlled Release**, v. 79, p. 123-135, 2002.

AVILA, D.S.; BENEDETTO, A.; AU, C.; MANARIN, F.; ERIKSON, K.; SOARES, F.A.; TEXEIRA, J.B.; ASCHNER, M. Organotellurium and organoselenium compounds attenuate Mn-induced toxicity in *Caenorhabditis elegans* by preventing oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, n. 9, p. 1903–1910, 2012.

AZEREDO, H. M. C. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. **Alimentos e Nutrição**, Araraquarav. 16, n. 1, p. 89-975, 2005.

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

BALANČ, B.; TRIFKOVIĆ K.; ĐORĐEVIĆ V.; MARKOVIĆ, S.; PJANOVIĆ, R.; NEDOVIĆ, V.; BUGARSKI, B. Novel resveratrol delivery systems based on alginate-sucrose and alginate-chitosan microbeads containing liposomes. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 832-842, 2016.

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, p. 191-203, 2006.

BALESTRO, E.; SANDRI, G.; FONTANA, R. Utilização de bagaço de uva com atividade antioxidante na formulação de barra de cereais. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 13, n. 2, p. 203-209, 2011.

BANSODE, S. S.; BANARJEE, S. K.; GAIKWAD, D. D.; JADHAV, S. L.; THORAT, R. M. Microencapsulation: a review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 1, n. 2, p. 38-43, 2010.

BARROS, F.A. R.; STRINGHETA, P. C. Microencapsulamento de antocianinas – uma alternativa para o aumento de sua aplicabilidade como ingrediente alimentício. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 36, p. 18-24, 2006.

BASTOS, D.; GONÇALVES, M.; TRISTÃO, C.; GOMES, K.; MIGUEZ, M. Microencapsulation of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) juice using a new chitosan–commercial bovine whey protein isolate system in spray drying. **Food and bioproducts processing**, v. 90, p. 683–692, 2012.

BAUMGARTEL, T.; KLUTH, H.; EPPERLEIN, K.; RODEHUTSCORD, M. Note on digestibility and energy value for sheep of different grape pomace. **Small Ruminant Research**, v. 67, p. 302-306, 2007.

BAYDAR, N. G.; BABALIK, Z.; TÜRK, F. H.; ÇETIN E. S. Phenolic Composition and Antioxidant Activities of Wines and Extracts of Some Grape Varieties Grown in Turkey. **Journal of Agricultural Sciences**, v. 17 p. 67-76, 2011.

BEHLING, E. B.; SENDÃO, M. C.; FRANCESCATO, H. D.; ANTUNES, L. M.; BIACHI, M. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.

BETZ, M.; KULOZIK, U. Microencapsulation of bioactive bilberry anthocyanins by means of whey protein gels, **Science Direct - Procedia Food Science**, v. 1, p. 2046 – 2056, 2011.

BHASKARAN, S.; BUTLER, J. A.; BECERRA, S.; FASSIO, V.; GIROTTI, M.; REA, S. L. Breaking *Caenorhabditis elegans* the easy way using the Balch homogenizer: an old tool for a new application. **Analytical Biochemistry**, v. 413, p. 123– 132, 2011

BHUSARI, S. N.; MUZAFFAR, K.; KUMAR, P. Effect of carrier agents on physical and microstructural properties of spray dried tamarind pulp powder. **Powder Technology**, v. 266, p. 354–364, 2014.

BOEIRA, B.; CALIARI, V.; GONZAGA, L.; KUSKOSKI, E.; FETT, R. Atividade antioxidante e conteúdo fenólico do resíduo agroindustrial da produção de vinho Antioxidant activity and phenolic content of agricultural by-products from wine production. **Ciências Agrárias**, v. 29, n. 1, p. 93-102, 2008.

BOO, E.E.; FILHO, R. M.; TOLEDO, E. C; B. Freeze drying porcess: real time model and optimization. **Chemical Engineering and Processing**, v. 43, p. 1475-1485, 2004.

BOONCHU, T. UTAMA-ANG, N. Optimization of extraction and microencapsulation of bioactive compounds from red grape (*Vitis vinifera* L.) pomace. **Journal Food Science Technology**, v. 52, n. 2, p. 783–792, 2015.

BORDIGNON-LUIZ, M. T.; GAUCHE, C.; GRIS, E. F.; FALCÃO, L. D. Colour stability of anthocyanins from Isabel grapes (*Vitis labrusca* L.) in model systems. **LWT – Food Science and Technology**, v. 40, n. 4, p. 594–599, 2007.

BRENES, A.; VIVEROS, A.; CHAMORRO, S.; ARIJA, I. Use of polyphenol-rich grape by-products in monogastric nutrition. A review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 211, p. 1–17, 2016.

BUCIC-KOJIC, A.; PLANINIC, M.; TOMAS, S.; BILIC, M.; VELIC, D. Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grapes seeds. **Journal of Food Engineering**, v. 81, n. 1, p. 236-242, 2007.

BUFFO, R. A.; REINECCIUS, G. A.; OEHLERT, G. W. Factors affecting the emulsifying and rheological properties of gum acacia in beverage emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 15, n. 1, p. 53-66, 2001.

BURIN, V. M.; FERREIRA-LIMA, N. E.; PANCERI, C. P.; BORDIGNON-Luiz, M. T. Bioactive compounds and antioxidant activity of *Vitis vinifera* and *Vitis labrusca* grapes: Evaluation of different extraction methods. **Microchemical Journal**, v. 114, p. 155-163, 2014

CACACE, J. E. ; MAZZA, G. Optimization of extraction of anthocyaninns from black with aqueous ethanol. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 1, p. 240-248, 2003.

CAMPOS, L. M. A. S.; LEIMANN, F. V.; PEDROSA, R. C.; FERREIRA, S. R. S. Free radical scavenging of grape pomace extracts from Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera*). **Bioresource Technology**, v. 99, p. 8413–8413, 2008.

CANO-CHAUCA, M.; STRINGHETA, P.C.; RAMOS, A.M.; CAL-VIDAL, C. Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 6, p. 420–428, 2005.

CARARETO, N. D. D.; MONTEIRO, F. E. S.; PESSÔA, P. A.; MEIRELLES, A. J. A. Water activity of aqueous solutions of ethylene oxide-propylene oxide block copolymers and maltodextrins. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 27, p. 173-181, 2010.

CARBONARO, M.; GRANT, G.; CAPPELLONI, M.; PUSZTAI, A. Perspectives into factors limiting in vivo digestion of legume proteins: Antinutritional compounds or storage proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, p. 742-749, 2000.

CARNEIRO, H. C. F.; TONON, R.V.; GROSSO, C.R.F.; HUBINGER, M.D. Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials. **Journal of Food Engineering**, v. 115, p. 443–451, 2013.

CATANEO, C. B.; CALIARI, V.; GONZAGA, L. V.; KUSKOSKI, E. M.; FETT, R. Atividade antioxidante e conteúdo fenólico do resíduo agroindustrial da produção de vinho. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n. 1, p. 93-102, 2008.

CASAZZA, A.; ALIAKBARIAN, B.; MANTEGNA, S.; CRAVOTTO, G.; PERGO, P. Extraction of phenolics from *Vitis vinifera* wastes using non-conventional techniques. **Journal of food Engineering**, v. 100, p. 50-55, 2010.

CHAN, K. W.; IQBAL, S.; KHONG, N. H. M.; BABJI, A. S. Preparation of deodorized antioxidant rich extracts from 15 selected spices through optimized aqueous extraction. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 25, p. 6067-6075, 2011.

CHARÃO, MF.; SOUTO, C.; BRUCKER, N.; BARTH, A.; JORNADA, DS.; FAGUNDEZ, D.; ÁVILA, DS.; EIFLER-LIMA, VL.; GUTERRES, SS.; POHLMANN, AR.; GARCIA, SC. *Caenorhabditis elegans* as an alternative in vivo model to determine oral uptake, nanotoxicity, and efficacy of melatonin-loaded lipid-core nanocapsules on paraquat damage, **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 5093–5106, 2015.

CHARLTON, A.; BAXTER, N.; KHAN, L.; MOIR, A.; HASLAM, E.; DAVIES, A.; WILLIAMSON, M. Polyphenol/peptide binding and precipitation. **J Agric Food Chem**, v. 50, p. 1593-1601, 2002.

CHAVES, M. C.; GOUVEIA, J. P.; ALMEIDA, F. A.; LEITE, J. C.; SILVA, F. L. Caracterização físico-química do suco da acerola. **Revista de Biologia e Ciências da terra**, v. 4, n. 2, 2004.

CHEN, Q.; ZHONG, F.; WEN, J.; MCGILLIVRAY, D.; QUEK, S. Y. Properties and stability of spray-dried and freeze-dried microcapsules co-encapsulated with fish oil, phytosterol esters, and limonene. **Dry Technology**, v. 31, p. 707–716, 2013a.

CHEN, W.; MÜLLER, D.; RICHLING, E.; WINK, M. Anthocyanin-rich Purple Wheat Prolongs the Life Span of *Caenorhabditis elegans* Probably by Activating the DAF-16/FOXO Transcription Factor. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 3047–3053, 2013b.

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

CISSÉ, M.; BOHUON, P.; SAMBE, F.; KANE, C.; SAKHO, M.; DORNIER, M. Aqueous extraction of anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa*: Experimental Kinetics and Modeling. **Journal of Food Engineering**, v. 109, p. 16–21, 2012.

CLIFF, M. A.; KING, M. C.; SCHLOSSER, J. Anthocyanin, phenolic composition, colour measurement and sensory analysis of BC commercial red wines. **Food Research International**, v. 40, p. 92–100, 2007.

CRATER, J. S.; CARRIER, R. L. Barrier properties of gastrointestinal mucus to nanoparticle transport. **Macromol. Biosci.**, v. 10, n. 12, p. 1473–1483, 2010.

CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; CLIFFORD, M. N. Dietary phenolics: Chemistry, bioavailability and effects on health. **Natural Product Reports**, v. 26, p. 1001–1043, 2009.

DA MOTA, R.; CARVALHO, C.; FAVERO, A.; PURGATTO, E.; MISUZU, T.; ALBUQUERQUE, M. Composição físico-química de uvas para vinho fino em ciclos de verão e inverno. **Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP**, v. 32, n. 4, p. 1127–1137, 2010.

DA MOTA, R.; DE SOUZA, C.; FAVERO, A.; CARVALHO, C.; LOPES DO CARMO, E.; FONSECA, A.; ALBUQUERQUE, M. Produtividade e composição físico-química de bagas de cultivares de uva em distintos porta-enxertos. **Pesq. agropec. bras.**, v. 44, n. 6, p. 576–582, 2009.

DA SILVA B.; SATO, S.; RUFFO, S. Caracterização fenológica e produtiva das videiras ‘Cabernet Sauvignon’ e ‘Alicante’ (*Vitis vinifera* L.) produzidas fora de época, no norte do Paraná. **Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP**, v. 32, n. 2, p. 451–462, 2010.

DAVIDOV-PARDO G.; AROZARENA I.; MARÍN-ARROYO, M. Optimization of a Wall Material Formulation to Microencapsulate a Grape Seed Extract Using a Mixture Design of Experiments. **Food Bioprocess Technol**, v. 6, p. 941–951, 2013.

DAVIDOV-PARDO, G.; MCCLEMENTS, D. Nutraceutical delivery systems: Resveratrol encapsulation in grape seed oil nanoemulsions formed by spontaneous emulsification. **Food Chemistry**, v. 167, p. 205–212, 2015.

DAZA, L.D.; FUJITA, A.; FÁVARO-TRINDADE, C.S.; RODRIGUES-RAC, J.N.; GRANATO, D.; GENOVESE, M. I. Effect of spray drying conditions on the physical

properties of Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) fruit extracts. **Food and Bioproducts Processing**, v. 97, p. 20-29, 2016.

DE BARROS FERNANDES, R. V.; MARQUES, G. R.; BORGES, S. V.; BOTREL, D. A. Effect of solids content and oil load on the microencapsulation process of rosemary essential oil. **Industrial Crops and Products**, v. 58, p. 173 –181, 2014.

DENG, Q.; PENNER, M.; ZHAO, Y. Chemical composition of dietary fiber and polyphenols of five different varieties of wine grape pomace skins. **Food Research International**, v. 44, n. 9, 2712-2720, 2011.

DESAI, K. G. H.; PARKA, H. J. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. **Drying Technology**, v. 23, n. 7, p. 1361-1394, 2005.

DESCAMPS, N.; PALZER, S.; ZUERCHER, U. The amorphous state of spray-dried maltodextrin: sub-sub-Tg enthalpy relaxation and impact of temperature and water annealing. **Carbohydr. Res.**, v. 344, p. 85–90, 2009.

DIAS, M.I. **Cultura *in vitro* e técnicas de microencapsulação: aumento da produção e da estabilidade de compostos bioativos de espécies vegetais**. 2016. 366f. Thesis (Doctorate in Sustainable Chemistry), Faculty of Science University from Porto, Portugal, 2016.

DIXIT, M.; KINI, A. G.; KULKARNI, P. K. Preparation and characterization of microparticles of piroxicam by spray drying and spray chilling methods. **Research in Pharmaceutical Science**, v. 52, n. 2, p. 87-89, 2010.

DUTRA, I.; ABREU, M.; PAES, I. Comparison between the spray drying and spray chilling microparticles contain ascorbic acid in a baked product application. **Food Science and Technology**, v. 65, p. 689-694, 2016.

ELNAGGAR, Y. S. R.; EL-MASSIK, A. M.; ABDALLAH, O. Y.; EBIAN, A. E. R. Maltodextrin: a novel excipient used in sugar-based orally disintegrating tablets and phase transition process. **AAPS Pharm Sci Tech**, v.11 p. 645-651, 2010.

EN-QIN, X.; GUI-FANG, D.; YA-JUN, G.; HUA-BIN, L. Biological Activities of Polyphenols from Grapes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 2, p. 622-646, 2010.

ERSUS, S.; YURDAGEL, U. Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* L.) by spray dryer. **Journal of Food Engineering**, v. 80, p. 805–812, 2007.

ESTEVINHO, B. N.; ROCHA, F.; SANTOS, L.; ALVES, A. Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications – A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 31, n. 2, p. 138–155, 2013.

FABRA, M.J.; TALENS, P.; MORAGA, G.; MARTINEZ-NAVARRETE, N. Sorption isotherms and state diagrams of grapefruit as tool to improve product processing and stability. **Journal of Food Engineering**, v. 93, p. 52-58, 2009.

FANG, Z.; BHANDARI, B. Encapsulation of polyphenols: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, p. 510-523, 2010.

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

FANG, Z.; BHANDARI, B. Encapsulation of polyphenols a review.. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, p. 510-523, 2010.

FARIA, H. C. I. T. **Estudo Comparativo de Citotoxicidade e Internalização de Nanopartículas de Ouro com diferentes revestimentos**. 2010. 159f. Dissertação (Mestrado em Toxicologia Analítica) - Universidade do Porto, 2010.

FATHI, M.; VARSHOSAZ, J.; MOHEBBI, M.; SHAHIDI, F. Hesperetin-Loaded Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructure Lipid Carriers for Food Fortification: Preparation, Characterization, and Modeling. **Food Bioprocess Technology**, v. 6, p. 1464 - 1475, 2013.

FELDBERG, N.; VIEIRA, R.; LIMA, W.; ALBUQUERQUE, M. Viabilidade da utilização de descartes de produção de uvas sem sementes para elaboração de passas. **Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal-SP**, v. 30, n. 3, p. 846-849, 2008.

FERNANDES, L.; CASAL, S.; CRUZ, R.; PEREIRA, J. A.; RAMALHOSA, E. Seed oils of ten traditional Portuguese grape varieties with interesting chemical and antioxidant properties. **Food Research International**, v. 50, n. 1, p. 161-166, 2013.

FERNANDES, R. V. B.; BORGES, S. V.; BOTREL, D. A. Gum arabic/starch/maltodextrin/inulin as wall materials on the microencapsulation of Rosemary essential oil. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 524–532, 2014.

FERNANDEZ, P.; ANDRÉ, V.; RIEGER, J.; KÜHMLE, A. Nanoemulsions formation by emulsion phase inversion. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 251, p. 53-58, 2004.

FERRARI, C. C.; GERMER, S. P. M.; ALVIM, I. D.; VISSOTTO, F. Z.; AGUIRRE, J. M. Influence of carrier agents on the physicochemical properties of blackberry powder produced by spray drying. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 47, p. 1237–1245, 2012.

FERRARI, C. C.; MARCONI, G. P.; ALVIM, I. D.; DE AGUIRRE, J. M. Storage stability of spray-dried blackberry powder produced with maltodextrin or gum arabic. **Drying Technology**, v. 31, p. 470-478, 2013.

FERREIRA, I.; BAPTISTA, P.; VILAS-BOAS, M.; BARROS, L. Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1511-1516, 2007.

FERRI, M.; TASSONI, A.; FRANCESCHETTI, M.; RIGHETTI, L.; NALDRETT, M.; BAGNI, N. Chitosan treatment induces changes of protein expression profile and stilbene distribution in *Vitis Vinifera* cell suspensions. **Proteomics**, v. 9, p. 610-624. 2009.

FERRUA, M.; SINGH, R. Modeling the fluid Dynamics in a human stomach to gain insight of food digestion. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 7, p. R151–R162, 2010.

FLAMINI, R. Mass spectrometry in grape and wine chemistry. Part I: Polyphenols. **Mass Spectrometry**, v. 22, p. 218-250, 2003.

FONTANA, A. R.; ANTONIOLLI, A.; BOTTINI, R. Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: extraction, characterization, and biotechnological applications of phenolics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 8987–9003, 2013.

FRAIGE, K. **Estudo comparativo do perfil metabômico e proteômico de uvas (*Vitis vinifera* L.) durante o processo de maturação utilizando ferramentas bionanalíticas**. 2002. 210f. Tese (Doutor em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

GABETTA, B.; FUZZATTI, N.; GRIFFINI, A.; LOLLA, E.; PACE, R.; RUFILLINI, T. Characterization of proanthocyanidins from grape seeds. **Fitoterapia**, v. 71, p. 172-175, 2000.

GAMBUTI, A.; STROLLO, D.; UGLIANO, M.; LECCE, L.; MOIO, L. Transresveratrol, quercetin, catechin and epicatechin content in south Italian monovarietal wines: relationship with maceration time and marc pressing during winemaking. **J. Agric. Food Chemistry**, v. 52, p. 5747-5751. 2004.

GAMI, M. S.; WOLKOW, C. A. Studies of *Caenorhabditis elegans* DAF-2/insulin signaling reveal targets for pharmacological manipulation of lifespan. **Aging Cell**, v. 5, n. 1, p. 31-37, 2006.

GARRIDO, J.; BORGES, F. Wine and grape polyphenols - A chemical perspective. **Food Research International**, v. 54, n. 2, p. 1844-1858. 2013.

GATTO, P.; VROVSEK, U.; MUTH, J.; SEGALA, C.; ROMUALDI, C.; FONTANA, P.; PRUEFER, D.; STEFANINI, M.; MOSER, C.; MATTIVI, F.; VELASCO, R. Ripening and genotype control stilbene accumulation in healthy grapes. **J. Agric. Food Chemical**, v. 56, p. 11773-11785, 2008.

GEMS, D.; RIDDLE, D. L. Defining wild-type life span in *Caenorhabditis elegans*. **The Journal of Gerontology**, v. 55, p. 393-401, 2000.

GHAFOOR, K.; CHOI, Y. H.; JEON, J. Y.; JO, I. H. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 4988–4994, 2009.

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

GHOSAL, S.; INDIRA, T. N.; BHATTACHARYA, S. Agglomeration of a model food powder: Effect of maltodextrin and gum Arabic dispersions on flow behavior and compacted mass. **Journal of Food Engineering**, v. 96, p. 222-228, 2010.

GIBIS, M.; VOGTA, E.; WEISS, J. Encapsulation of polyphenolic grape seed extract in polymer-coated liposomes. **Food Funct**, v. 3, p. 246-254, 2012.

GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Anthocyanins, Characterization and Measurement with UV-Visible Spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, v. 2, p. 1-13. 2001.

GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Anthocyanins, Characterization and Measurement with UV-Visible Spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, v. 2, p. 1-13. 2001.

GOMEZ-PLAZA, E.; MINANO, A.; LOPÉZ-ROCA, J. M. Comparison of chromatic properties, stability and antioxidant capacity of anthocyanin-based aqueous extracts from grape pomace obtained from different vinification methods. **Food Chemistry**, v. 97, n.1, p. 87-94, 2006.

GONZÁLEZ-CENTENO, M. R.; ROSSELLÓ, C.; SIMAL, S.; GARAU, M. C.; LÓPEZ, F.; FEMENIA, A. Physico-chemical properties of cell wall materials obtained from tem grape varieties and their By-products: Grape pomace and stems. **LWT Food Science and Technology**, v. 43, p. 1580 - 1586, 2010.

GONZALEZ-MORAGAS, L.; ROIG, A.; LAROMAIN, A. *C. elegans* as a tool for in vivo nanoparticle assessment. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 219, p. 10–26, 2015.

GONZÁLEZ-PARAMÁS, A.; ESTEBAN-RUANO, S.; SANTOS-BUELGA, C.; PASCUAL-TERESA, S.; RIVAS-GONZALO, J. Flavanol content and antioxidant activity in winery by products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 234–238, 2004.

GORINSTEIN, S.; CVIKROVA, M.; MACHACKOVA, I.; HARUENKIT R.; PARK, J.; JUNG, S. Characterization of antioxidant compounds in Jaffa sweets and White grape fruits. **Food Chemistry**, v. 84, p. 503-510, 2004.

GOULA, A. ADAMOPOULOS, K. Effect of maltodextrina addition during spray dryin of tomato pulp in dehumified air: I. Drying kinetics and recovery. **Dry Technol**, v. 26, n.6, p. 714-725, 2008.

GU, Q.; ZOU, A.; YUAN, C.; GUO, R. Effects of a bolaamphiphile on the structure of phosphatidylcholine liposomes. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 266, p. 442-447, 2003.

GUENDEZ, R.; KALLITHRAKA, S.; MAKRIS, D. P.; KEFALAS, P. Determination of low molecular weight polyphenolic constituents in grape (*Vitis vinifera* sp.) seed extracts: Correlation with antiradical activity. **Food Chemistry**, v. 89, n. 1, p. 1-9, 2005.

GUERRA, A.; ETIENNE-MESMIN, L.; LIVRELLI, V.; DENIS, S.; BLANQUET-DIOT, S.; ALRIC, M. Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 11, p. 591-600, 2012.

GUILHERME, M. R. **Desenvolvimento de hidrogéis superabsorventes para uso eficiente de água**. 2006. 125f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Estadual de Maringá. Maringá, 2006.

HAYASAKA, Y.; WATERS, E. J.; CHEYNIER, V.; HERDERICH, M. J.; VIDAL, S. Characterization of proanthocyanidins in grape seeds using electrospray mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 17, p. 9-10, 2003.

HELLMCKE, K. J.; AVILA, D. S.; ASCHNER, M. Utility of *Caenorhabditis elegans* in high neurotoxicological research. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 32, p. 62-67, 2010.

HERRERO, A.; BARJA, G. Localization of the Site of Oxygen Radical Generation inside the Complex I of Heart and Nonsynaptic Brain Mammalian Mitochondria. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 32, p. 609-615, 2000.

HEURTAULT, B.; SAULNIER, P.; PECH, B.; PROUST, J.E.; BENOIT, J.P. Physicochemical stability of colloidal lipid particles. **Biomaterials**, v. 24, p. 4283-4300, 2003.

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.

HOLST, B.; WILLIAMSON, G. Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, p. 73-82, 2008.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005.

HUNG, L.H.; HORAGAI, Y.; KIMURA, Y.; ADACHI, S.. Decomposition and discoloration of L-ascorbic acid freeze-dried with saccharides. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 8, n. 4, p. 500-506, 2007.

HUSSAIN, N.; JAITLEY, V.; FLORENCE, A. T. Recent advances in the understanding of uptake of microparticulates across the gastrointestinal lymphatics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 50, p. 107-142, 2001.

IACOPINI, P.; BALDI, M.; STORCHI, P.; SEBASTIANI, L. Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro antioxidant activity and interactions. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, p. 589-598, 2008.

ISMAIL, H. I.; CHAN, K. W.; MARIOD, A. A.; ISMAIL, M. Phenolic content and antioxidant activity of cantaloupe (*Cucumis melo*) methanolic extracts. **Food Chemistry**, v. 119, n. 2, p. 643-647, 2010.

IVANOVA, V.; STEFOVA, M.; CHINNICI, F. Determination of the polyphenol contents in Macedonian grapes and wines by standardized spectrophotometric methods. **J. Serb. Chem. Soc.**, v. 75, n. 1, p. 45-59, 2010.

JAFARI, S. M.; ASSADPOOR, E.; HE, Y.; BHANDARI, B. Encapsulation efficiency of food flavours and oils during spray drying. **Drying Technology**, v. 26, n. 7, p. 816-835, 2008.

JARA-PALACIOS, J. M.; HERNANZ, D.; ESCUDERO-GILETE, L. M.; HEREDIA, F. J. Antioxidant potential of white grape pomaces: Phenolic composition and antioxidant capacity measured by spectrophotometric and cyclic voltammetry methods. **Food Research International**, v. 66, p. 150–157, 2014.

JAYA, S.; DAS, H. Effect of maltodextrin, glycerol monostearate and tricalcium phosphate on vacuum dried mango powder properties. **Journal of Food Engineering**, v. 63, p. 125-134, 2004.

JINAPONG, N.; SUPHANTHARIKA, M.; JAMNONG, P. Production of instant soymilk powders by ultrafiltration, spray drying and fluidized bed agglomeration. **Journal of Food Engineering**, v. 84, n. 2, p. 194-205, 2008.

JYOTHI, N. V. N.; PRASANNA, M. P.; SAKARKAR, N. S.; PRABHA, S. K.; RAMAIAH, S. P.; SRAWAN, G. Y. Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. **Journal of Microencapsulation**, v. 27, n. 3, p. 187 -197, 2010.

KALETTA, T.; HENGARTNER, M. O. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 5, p. 387-399, 2006.

KENNEDY, J. A. Grape and wine phenolics: Observations and recent findings. **Ciencia e Investigación Agraria**, v. 35, n. 2, p. 107-120, 2008.

KENNEDY, J.A.; MATTHEWS, M. A.; WATERHOUSE, A. L. Effect of Maturity and Vine Water Status on Grape Skin and Wine Flavonoids. **Am. J. Enol. Vitic.** v. 53, p. 268-274, 2002.

KILMARTIN, P. A.; REID, D. S.; SAMSON, I. Dielectric properties of frozen maltodextrin solutions with added NaCl across the glass transition. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, p. 1277–1284, 2004.

KOGA, CC.; ANDRADE, JE.; FERRUZZI, MG.; LEE, Y. Stability of *Trans*-Resveratrol encapsulated in a Protein Matrix Produced Using Spray Drying to UV Light Stress and Simulated Gastro-Intestinal Digestion. **Journal of Food Science**, v. 81, n. 2, p. 292-300, 2016.

KOSARAJU, S. L.; LABBETT, D.; EMIN, M.; KONCZAK, I.; LUNDIN, L. Delivering polyphenols for healthy ageing. **Nutrition & Dietetics**, v. 65, p. S48 - S52, 2008.

KUANG, S. S.; OLIVEIRA, J. C.; CREAN, A. M. Microencapsulation as a tool for incorporating bioactive ingredients into food. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 50, n. 10, p. 1913-1918, 2010.

KUBOTA, M.; SAITO, Y.; MASUMURA, T.; KUMAGAI, T.; WATANABE, R.; FUJIMURA, S.; KADOWAKI, M. Improvement in the *In vivo* digestibility of Rice protein by alkali extration is due to structural changes in prolamin/protein body-I particles. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 74, n. 3, p. 614-619, 2010.

KUCK, L.S. E.; NOREÑA, C.P.Z. Microencapsulation of grape (*Vitis labrusca* var. Bordo) skin phenolic extract using gum Arabic, polydextrose, and partially hydrolyzed guar gum as encapsulating agents. **Food Chemistry**, v. 194, p. 569–576, 2016.

KUMAR, N.; RAVIKUMAR, M. N. V.; DOMB, A. J. Biodegradable block copolymers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 53, p. 23-44, 2001.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; TRONCOSO, A. M.; GARCIA M.; FETT, R. Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 691-693, 2004.

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

LAGO-VANZELA, E.; DA SILVA, R.; GOMES, E.; GARCIA-ROMERO, E.; HERMOSIN-GUTIERREZ, I. Phenolic acomposition of the edble parts (flesh and skin) of bordõ grape (*Vitis labrusca*) using HPLC-DAD-ESI-MS/MS. **Journal agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 13136-13146, 2011.

LAPORNIK, B.; PROSEK, M.; WONDRA, A. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. **Journal of Food Engineering**, Slovenia. v. 71, p. 214-222. 2005.

LEUNG, M. C.; WILLIAMS, P. L.; BENEDETTO, A.; AU, C.; HELMMCKE, K. J.; ASCHNER, M.; MEYER, J. N. Review: *Caenorhabditis elegans*: An Emerging Model in Biomedical and Environmental Toxicology. **Toxicological Sciences**. v. 106, n. 1, p. 5-28, 2008.

LI, F.; WENG, Y.; WANG, L.; HE, H.; YANG, J.; TANG, X. The efficacy and safety of bufadienolides-loaded nanostructured lipid carriers. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 393, p. 203-2011, 2010.

LIMA, M. E.; COLPO, A. C.; SALGUEIRO, W. G.; SARDINHA, G. E.; ÁVILA, D. S.; FOLMER, V. *Ilex paraguariensis* Extract Increases Lifespan and Protects Against the Toxic Effects Caused by Paraquat in *Caenorhabditis elegans*. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 11, p. 10091-10104, 2014.

LIU, C.; WANG, L.; WANG, J.; WU, B.; LIU, W.; FAN, P.; LIANG, Z.; LI, S. Resveratrol in Vitis berry skins and leaves: Their extraction and analysis by HPLC. **Journal of Food Chemistry**, v. 136, p. 643-649, 2013.

LLOBERA, A.; CAÑELLAS, J. Dietary fibre content and antioxidant activity of Manto Negro red grape (*Vitis vinifera*): pomace and stem. **Food Chemistry**, v. 101, p. 659-666, 2007.

MACEDO, L. F.; ROGERO, M.; GUIMARAES, J.; GRANATO, D.; LOBATO, L.; CASTRO, I. A. Effect of red wines with different in vitro antioxidant activity on oxidative stress of high-fat diet rats. **Food Chemistry**, v. 137, n. 1, p. 122-129, 2013.

- MACHADO, A.R.; ASSIS, L.M.; MACHADO M.I.R.; SOUZA-SOARES, L.A. Importance of lecithin for encapsulation processes. **African Journal Food Science**, v. 8, n. 4, p. 176-183, 2014.
- MADENE, A.; MURIEL, J.; SCHER, J.; DESOBRY, S. Flavour encapsulation and controlled release - a review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 41, n. 1, p. 1-21, 2006.
- MAHDAVI, A. A.; JAFARI, S. M.; DPOOR, E. A.; DEHNAD, D. Microencapsulation optimization of natural anthocyanins with maltodextrin, gum Arabic and gelatin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 85, p. 379-385, 2016.
- MAIER, T.; SCHIEBERA, A.; KAMMERERA, D. R.; CARLE, R. Residues of grape (*Vitis vinifera* L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. **Food chemistry**, v. 112, n. 3, p. 551-559, 2009.
- MAKRIS, D. P.; BOSKOU, G.; ANDRIKOPOULOS, N. K. Polyphenolic content and in vitro antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts. **Journal of Food Composition And Analysis**, v. 20, n. 2, p. 125-132, 2007.
- MALACRIDA, C. R.; MOTTA, S. Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva. **Revista Ciência e Tecnologia em Alimentos, Campinas**, v. 25, n. 4, p. 659-664, 2005.
- MALATAINS, A.; JONES, O. G.; MCCLEMENTS, D. J. Structured biopolymerbased delivery systems for encapsulation, protection, and release of lipophilic compounds. **Food Hydrocolloids**, v.25, n.8, p.1865-1880, 2011.
- MANACH, C.; WILLIAMSON, G.; MORAND, C.; SCALBERT, A.; RÉMÉSY, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, p. 230S-242S, 2005.
- MANTELL, C.; RODRIGUEZ, M.; MARTINEZ DA OSSA, E. Semi-batch extraction of anthocyanins from red grape pomace in packed beds: experimental results and process modeling. **Chemical Engineering Science**, v. 57, p. 3831-3838, 2002.
- MARINOVA, D.; RIBAROVA, F.; ATANASSOVA, M. Total phenolics and total flavonoids in bulgarian fruits and vegetables. **Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy**, v. 40, n. 3, p. 255-260, 2005.
- MARTINELLI, L.; GABAS, A. L.; TELIS-ROMERO, J. T. Thermodynamic and quality properties of lemon juice powder as affected by maltodextrin and arabic gum. **Drying Technology**, v. 25, p. 2035-2045, 2007.
- MARTINS, E. D.; LEONARDI, R. R.; OLIVEIRA, C. R.; MATSUMOT, F. M. T. Liofilização como alternativa para conservação do leite humano. **Health Sci. Inst.**, v. 29, p. 119-122, 2011.
- MCRAE, J. M.; KENNEDY, J.A. Wine and grape tannin interaction with salivary proteins and their impact on astringency: a review of current research. **Molecules**, v. 16, p. 2348-2364, 2011.

MELLO, L. M. R.; Da Silva, G. A. Disponibilidade e Características de Resíduos Provenientes da Agroindústria de Processamento de Uva do Rio Grande do Sul: panorama 2014. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho. Comunicado Técnico 155, p. 6, 2015.

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**, Santa Maria, v. 41, n.6, p. 1088-1093, 2011.

MENDES, J. A. S.; PROZIL, S. O.; EVTUGUIN, D. V.; LOPES, L. P. C. Towards comprehensive utilization of winemaking residues: Characterization of grape skins from red grape pomaces of variety Touriga Nacional. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 25–32, 2013.

MENG, G. T.; MA, C. Y. Thermal properties of *Phaseolus angularis* (Red bean) globulin. **Food Chemistry**, v. 23, n. 4, p. 453–460, 2001.

MENSACK, M. M.; FITZGERALD, V. K.; LEWIS, M. R.; THOMPSON, H. J. Characterization of low molecular weight chemical fractions of dry bean (*Phaseolus vulgaris*) for bioactivity using *Caenorhabditis elegans* longevity and metabolite fingerprinting. **J. Agric Food Chem**, v. 58, n. 11, p. 6697-705, 2010.

MITIĆ, M.; SOUQUET, J.; OBRADOVIĆ, M.; MITIĆ, S. Phytochemical profiles and antioxidant activities of Serbian table and wine grapes. **Food Science and Biotechnology**, v. 21, p. 1619-1626, 2012.

MONRAND, J. K.; HOWARD, L. R.; KING, J. W.; SRINIVAS, K.; MAUROMOUSTAKOS, A. Subcritical solvent extraction of anthocyanins from dried red grape pomace. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 2862-2868, 2010.

MONTEALEGRE, R. R.; PECES, R. R.; VOZMEDIANO, J. L. C.; GASCUEÑA, J. M.; ROMERO, E. G. Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 687-693, 2006.

MOON, J. K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant assays for plant and food components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 1655-1666, 2009.

MOSER, P.; SOUZA, R.; NICOLETTI, N.. Spray drying of grape juice from hybrid cv. brs violeta: microencapsulation of anthocyanins using protein/maltodextrin blends as drying Aids. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 41, p. 1-11, 2016.

MOSQUEIRA, V. C F.; LEITE E. A.; BARROS C. M.; VILELA J. M. C.; ANDRADE M. S. Polymeric nanostructures for drug delivery: characterization by atomic force microscopy. **Microscopy & Microanalysis**, v. 1, n.3, p. 36-39, 2005

MOTA, R. V.; SOUZA, C. R.; FAVERO, A. C.; SILVA, S. P.; CARMO, E. L.; FONSECA, A. R.; MURILLO, R. Produtividade e composição físico-química de bagas de cultivares de

uva em distintos porta-enxertos. **Pesquisa Agropecuária brasileira**, Brasília, v. 44, n.6, p.576-582, 2009.

MULLER, F. L.; LIU, Y.; ABDUL-GHANI, M. A.; LUSTGARTEN, M. S.; BHATTACHARYA, A. Suppression by flavonoids of cyclooxygenase-2 promoter-dependent transcriptional activity in colon cancer cells: Structure-activity relationship. **Jpn J. Cancer Res**, v. 91, p. 686-691, 2000.

MURGA, R.; RUIZ, R.; BELTRÁN, S.; CABEZAS, J. L. Extraction of natural complex phenols and tannins from grape seeds by using supercritical mixtures of carbon dioxide and alcohol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 8, p. 3408-3412, 2000.

NARDOIA, M. **Effect of dietary polyphenol-rich grape byproducts on growth performance, some physiological parameters, meat and meat products quality in chickens academic year**. 2015. 244f. Thesis (Doctorate in science and animal technology)-University of molise, Spanish, 2015.

NEGRO, C.; TOMMASI, L; MICELI, A. Phenolic compound as and antioxidant activity from red grape marc extracts. **Bioresource Technology**, v. 87, p. 41-44, 2003.

NENADIS, N.; WANG, L. F.; TSIMIDOU, M.; ZHANG, H. Y. Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS^{•+} assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 4669-4674, 2004.

NIJDAM, J.J.; LANGRISH, T.A.G.; The effect of surface composition on the functional properties of milk powders. **Journal of Food Engineering**, v. 77, p. 919-952, 2006.

NIXDORF, S. L.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. Brazilian Red Wines Made from the Hybrid Grape Cultivar Isabel: Phenolic Composition and Antioxidant Activity. **Analytica Chimica Acta**, v. 659, p. 208-215, 2010.

OLIVEIRA D. A.; SALVADOR, A. A.; SMÂNIA, E. F. A.; MARASCHIN, M.; FERREIRA, S. R. S. Antimicrobial activity and composition profile of grape (*Vitis vinifera*) pomace extracts obtained by supercritical fluids. **Journal of Biotechnology**, v. 164, p. 423–432, 2013.

OLIVEIRA, V. E. **Potencial neurotóxico do alumínio como modelo da doença de alzheimer em *Caenorhabditis elegans***. 2016. 50f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Chapecó, 2016.

OURIQUE, A. F.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BECKD, R. C. R. Tretinoin-loaded nanocapsules: Preparation, physicochemical characterization, and photostability study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 352, p. 1-4, 2008.

PANCERI, C. P.; GOMES, T. M.; GOIS, J. S.; BORGES, D. L. G.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Effect of dehydration process on mineral content, phenolic compounds and antioxidant activity of Cabernet Sauvignon and Merlot grapes. **Food Research International**, v. 54, p. 1343–1350, 2013.

PASSOS, C. P.; CARDOSO, S. M.; ROSARIO, M.; DOMINGUES, M.; Evidence for galloylated type- A procyanidins in grape seeds. **Food Chemistry**, v. 105, P. 1457-1467, 2007.

PETERS, R.; KRAMER, E.; OOMEN, A.; HERRERA-RIVERA, Z.; OEGEMA, G.; TROMP, P. Presence of nano-sized silica during in vitro digestion of foods containing silica as a food additive. **ACS Nano**, v. 6, n. 3, p. 2441-2451, 2012.

PHISUT, N. Spray drying technique of fruit juice powder: some factors influencing the properties of product. **International Food Research Journal**, v. 19, n. 4, p. 1297-1306, 2012.

PINELO, M.; ARNOUS, A.; MEYER, A. S. Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. **Trends in Food Science and Technology**, v. 17, n. 11, p. 579-590, 2006.

PINELO, M.; RUBILAR, M.; JEREZ, M.; SINEIRO, J.; NÚÑEZ, M. Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. **Journal of the Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 2111-2117, 2005.

PINELO, N.; FABBRO, P.; MANZOCCO, L. Optimization of continuous phenol extraction from *Vitis vinifera* by products. **Food Chemistry**, v. 92, p. 109-117. 2005.

PINHEIRO, A.C.; LAD, M.; SILVA, H.D.; COIMBRA, M.A.; BOLAND, M.; VICENTE, A.A. Unravelling the behavior of curcumin nanoemulsions during in vitro digestion: effect of the surface charge. **Soft Matter**, v. 9, n. 11, p. 3147-3154, 2013.

POLAK, R.; PIOTOMBO, R. N. M. Care during freeze-drying of bovine pericardium tissue to be used as a biomaterial: A comparative study. **Cryobiology**, v. 63, p. 61-66, 2011.

PORRARUD, S.; PRANEE, A. Microencapsulation of Zn-chlorophyll pigment from Pandan leaf by spray drying and its characteristic. **International Food Research Journal**, v. 17, p. 1031-1042, 2010.

POURASHOURI, P.; SHABANPOUR, B.; RAZAVI, S.H.; JAFARI, S.M.; SHABANI, A.; AUBOURG, S.P. 2014. Impact of wall materials on physicochemical properties of microencapsulated fish oil by spray drying, **Food Bioprocess Technology**, v. 7, n. 8, p. 2354-2365, 2014.

QUEK, S. Y.; CHOK, N. K.; SWEDLUND, P. The physicochemical properties of spray-dried watermelon powders. **Chemical Engineering and Processing**, v. 46, p. 386-392, 2007.

RATHORE, S.; DESAI, P. M.; LIEW, C. V.; CHAN, L. W.; HENG, P. W. S. Review- Microencapsulation of microbial cells. **Journal of food engineering**, v. 116, n. 2, p. 369-381, 2013.

REBELLO, L.; LAGO-VANZELA, E.; BARCIA, M. T.; RAMOS, A.; STRINGHETA, P.; DA-SILVA, R.; CASTILLO-MUÑOZ, N.; GÓMEZ-ALONSO, S.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ I. Phenolic composition of the berry parts of hybrid grape cultivar BRS Violeta

(BRS Rubea×IAC 1398-21) using HPLC–DAD–ESI-MS/MS. **Food Research International**, v. 54, p. 354–366, 2013.

REIS, P.; RAAB, T.; CHUAT, J.; LESER, M.; MILLER, R.; WATZKE, H., Influence of surfactants on lipase fat digestion in a model gastro-intestinal system. **Food Biophysics**, v. 3, n. 4, p. 370-381, 2008.

RIBEIRO, T. P. **Maturação, qualidade, compostos bioativos e atividade antioxidante de uvas americanas e dos sucos elaborados no Submédio do Vale do São Francisco**. 2011. 137f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2011.

RIGHETTO, A. M.; NETTO, F. M. Effect of encapsulating materials on water sorption, glass, transition and stability of juice from immature acerola. **International Journal of Food Properties**, v. 8, p. 337-346, 2005.

RIZZON, L. A.; MIELE, A. Características analíticas de vinhos Merlot da Serra Gaúcha. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 39, n. 6, p. 1913-1916, 2009.

ROBBINS, R. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. **J. Agric. Food Chem.** v. 51, p. 2866-2887, 2003.

ROCHA, G. A.; FÁVARO-TRINDADE, C. S.; GROSSO, C. R. F. Microencapsulation of lycopene by spray drying: Characterization, stability and application of microcapsules. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, p. 37-42, 2012.

ROCHA-PARRA, D.F.; LANARI, M.C.; ZAMORA, M.C.; CHIRIFE, J. Influence of storage conditions on phenolic compounds stability, antioxidant capacity and colour of freeze-dried encapsulated red wine. **LWT - Food Science and Technology**, v. 70, p. 162-170, 2016.

ROCKENBACH, I.; GONZAGA, L.; RIZELIO, V.; GONÇALVES, A.; GENOVESE, M.; FETT, R. Phenolic compounds and antioxidant activity of seed and skin extracts of red grape (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) pomace from Brazilian winemaking. **Food Research International**, v. 44, p. 897–901, 2011a.

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

RODRÍGUEZ, J.; MARTÍN, M. J.; RUIZ, M. A.; CLARES, B. Current encapsulation strategies for bioactive oils: From alimentary to pharmaceutical perspectives. **Food Research International**, v. 83, p. 41 – 59, 2016.

RODRIGUEZ, R.; ROMERO, R.; CHACON, J.; MARTINEZ, J.; GARCIA, E. phenolics compounds in skins and of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 687-693, 2006.

RODRIGUEZ-SAONA, L.E.; WROLSTAD, R.R. Extraction, isolation, and purification of anthocyanins. **Currents Protocols in Food Analytical Chemistry**, p. F 1.1.1-F1.1.11, 2001.

ROESLER, R.; GOMES, L.; CARRASCO, L. C.; BARATA, R.; SOUSA, C. A.; ASTORE, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 53-60, 2007.

ROMERO-PEREZ, A.; LAMUELA-RAVENTOS, R.; ANDRE-LACUEVA, C.; DA TORRE-BORONAT, C. Method for the quantitative extraction of resveratrol and piceid isomers in grape Berry skins. Effect of powdery mildew on the stilbene content. **J. Agric. Food chemistry**, v. 49, p. 210-215, 2001.

ROSSETTI, D.; YAKUBOV, G. E.; STOKES, J. R.; WILLIAMSON, A. M.; FULLER, G. G. Interaction of human whole saliva and astringent dietary compounds investigated by interfacial shear rheology. **Food Hydrocolloids**, v. 22, P. 1068-1078, 2008.

RUBERTO, G.; RENDA, A.; DAQUINO, C.; AMICO, V.; SPATAFORA, C.; TRINGALI, C.; DE TOMMASI, N. Polyphenol constituents and antioxidant activity of grape pomace extracts from five Sicilian red grape cultivars. **Food Chemistry**, v. 100, p. 203-210, 2007.

SAMAVARDHANA, K.; SUPAWITITPATTANA, P.; JITTREPOTCH, N., ROJSUNTORNKITTI, K.; KONGBANGKARD, T. Effects of extracting conditions on phenolic compounds and antioxidant activity from different grape processing byproducts. **International Food Research Journal**, v. 22, n. 3, p. 1169-1179, 2015.

SANCHEZ-ALONZO, I.; JIMENEZ-ESCRIG, A.; SAURA-CALIXTO, F.; BORDERIAS, A. Antioxidant protection of white-grape pomace on restructures fish products during frozen storage. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v. 41, p. 42-50, 2008.

SANCHEZ-ALONZO, I.; SOLA, M.; BORDERIAS, A. Physical study of minced fish muscle with a white-grape by-product added as an ingredient. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 2, p. 94-1001, 2007.

SANTANA, A. A.; PEREIRA, L. G.; OLIVEIRA, R. A.; KUROZAWA, L. E.; PARK, K. J. Spray Drying of Babassu Coconut Milk Using Different Carrier Agents. **Journal Drying Technology, An International Journal**, v. 35, n. 1, p. 76-87. 2017.

SANTOS-GOMES, P. C.; SEABRA, R. M.; ANDRADE, P. B.; FERNANDES-FERREIRA, M. Determination of phenolic antioxidant compounds produced by calli and cell suspensions of sage (*Salvia officinalis* L.). **Journal of Plant Physiology**, v. 160, p. 1025-1032, 2003.

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 Tecnologia Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 3, p. 437-442, 2005.

SÁYAGO-AYERDI, S. G.; BRENES, A.; GOÑI, I. Antioxidative effect of dietary grape pomace concentrate on lipid oxidation of chilled and long-term frozen stored chicken patties. **Meat Science**, v. 83, p. 528-533, 2009.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITA, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Quím. Nova**, v. 26, p. 726-737, 2003.

- SCHMITZ-SCHUG, I.; KULOZIK, U.; FOERST, P. Modeling spray drying of dairy products- Impact of drying kinetics, reaction kinetics and spray drying conditions on lysine loss. **Chemical Engineering Science**, v. 141, p. 315–329, 2016.
- SCHROOYEN, P. M. M.; VAN DER MEER, R.; DE KRUIF, C. G. Microencapsulation: its application in nutrition. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 60, p. 475-479, 2001.
- SESSA, M.; TSAO, R.; LIU, R.; FERRARI, G.; DONSI, F. Evaluation of the stability and antioxidant activity of nanoencapsulated resveratrol during *in vitro* digestion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 12352- 12360, 2011.
- SHAH, P.; BHALODIA, D.; SHELAT, P. Nanoemulsion: A Pharmaceutical review. **Systematic Reviews in Pharmacy**, v. 01, p. 24-32, 2010.
- SHARMA, A.; JANA, A.H.; CHAVAN, R.S. Functionality of Milk Powders and Milk-Based Powders for End Use Applications - A Review. **Journal Food Science e Food Safety**, v. 11, n. 5, p. 518–528, 2012.
- SHI, J.; YU, J.; POHORLY, J. E.; KAKUDA, Y. Polyphenolics in grape seeds Biochemistry and Functionality. **Journal of Medicinal Food**, v. 6, n. 4, p. 291-299, 2003.
- SHOFINITA, D.; LANGRISH, T. A. G. Spray drying of orange peel extracts: Yield, total phenolic content, and economic evaluation. **Journal of Food Engineering**, v. 139, p. 31–42, 2014.
- SHRESTHA, AK; UA-ARAK, T; ADHIKARI, BP; BHANDARI, BR. Glass transition behavior of spray dried Orange juice powder measured by differential scanning calorimetry (dsc) and thermal mechanical compression test (TMCT), **International Journal of Food Properties**, v. 10, p. 661–673, 2007
- SILVA, H.; ROXO, M.; KRSTIN, S.; RÖHRIG, T.; RICHLING, E.; WINK, M. An Anthocyanin-Rich Extract of Acai (*Euterpe precatoria* Mart.) Increases Stress Resistance and Retards Aging-Related Markers in *Caenorhabditis elegans*. **J. Agric Food Chemical**, v. 64, n. 6, p.1283-1290, 2016.
- SILVA, M. L. C.; COSTA, R. S.; SANTANA, A. S.; KOBLITZ, M. G. B. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.
- SILVA, V.; GENTA, G.; MÖLLER, M.; MASNER, M.; THOMSON, L.; ROMERO, N.; RADI, R.; FERNANDES, D.; LAURINDO, F.; HEINZEN, H.; FIERRO, W.; DENICOLA, A. Antioxidant activity of uruguayan propolis. In vitro and cellular assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 12, p. 6430-6437, 2011.
- SINEIRO, D.; RUBILAR, M.; SÁNCHEZ, S.; JEREZ, J.; PINELO, M.; COSTOYA, N.; NÚÑEZ, M. Polyphenols from plant materials: extraction and antioxidant power. **J. Agric. Food Chemistry**, v. 7, n. 8, p. 3210-3216, 2008.

SINGH, M. N.; HEMANT, K. S. Y.; RAM, M.; SHIVAKUMAR, H. G. Microencapsulation: A promising technique for controlled drug delivery. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 5, p. 65 –77, 2014.

SIQUEIRA, P.; BOONE, K.; TIVERONI, A.; PRADO, A. CADORIN, T.; ZANUS, M.; PEREIRA, G.; MATIAS, S. Composição fenólica e atividade antioxidante de resíduos agroindustriais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 6, p. 1088-1093, 2011.

SOARES, A. P.; KIMI, U, S.; NOGUERIA, N.J. F.; ROSA, G. Hypocaloric diet associated with the consumption of jam enriched with microencapsulated fish oil decreases insulin resistance. **Nutrición Hospitalaria**, v. 29, p. 1103 –1108, 2014.

SOARES, M.; WELTER, L.; KUSKOSKI, E.; GONZAGA, L.; FETT, R. Compostos fenólicos e atividade antioxidante da casca de uvas Niágara e Isabel. **Rev. Brasileira de Fruticultura Jaboticabal - SP**, v. 30, n. 1, p. 059-064, 2008.

SOLIS, G. M.; PETRASCHECK, M.. Measuring *Caenorhabditis elegans* life span in 96 well microtiter plates, **Journal of Visualized Experiments: JovE**, v. 49, p. 1-6, 2011.

SONI, N. O. Resveratrol nanoparticle's formulation - in diabetic nephropathy. **World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences**, v. 6, n. 9, p. 368-386, 2017.

SOUZA, V. B. **Aproveitamento dos subprodutos de vinificação da uva Bordô (*Vitis Labrusca*) para obtenção de pigmentos com propriedades funcionais**. 2013. 122f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

SOUZA, V. B.; FUJITA, A.; THOMAZINI, M.; DA SILVA, E. R.; LUCON, J. F.; GENOVESE, M. I.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Functional properties and stability of spray-dried pigments from Bordo grape (*Vitis labrusca*) winemaking pomace. **Food Chemistry**, v. 164, p. 380–386, 2014.

SOUZA, V. B.; THOMAZINI, M.; BALIEIRO, J. C. C.; FÁVARO-TRINDADE, C. S. Effect of spray drying on the physicochemical properties and color stability of the powdered pigment obtained from vinification byproducts of the Bordo grape (*Vitis labrusca*). **Food and Bioproducts Processing**, v. 93, p. 39–50, 2015.

SPIGNO, G.; DE FAVERI, D. Antioxidants from grape stalks and Marc: Influence of extraction procedure on yield, purity and antioxidant Power of the extracts. **Journal of Food Engineering**, v. 78, p. 793-801, 2007.

STOLL, L.; COSTA, T. M.; JABLONSKI, A.; HICKMANN, S.; RIOS, A. Microencapsulation of Anthocyanins with Different Wall Materials and Its Application in Active Biodegradable Films. **Food and Bioprocess Technology**, v. 9, n. 1, p. 172–181, 2016.

SUN, B.; RIBES, A. M.; LEANDRO, M. C.; BELCHIOR, A. P.; SPRANGER, M. I. Stilbenes: quantitative extraction from grape skin, contribution of grape solids to wine and variation during wine maturation. **Analytica Chimica Acta**, v. 563, p. 382-390, 2006.

SURCO F. A. **Avaliação da atividade de flavonóides e seus metabolitos no organismo modelo *Caenorhabditis elegans***. 2011. 198f. Tese (Doutorado em alimentação e meio ambiente) - Universidade de Salamanca, Espanha, 2011.

SURVESWARAN, S.; CAI, Y. Z.; CORKE, H.; SUN, M. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. **Food Chemistry**, v. 102, n. 3, p. 938-953, 2007.

TAKAHASHI, A. I. **Obtenção e caracterização de complexos binários e ternários de sinvastatina e ciclodextrinas**. 2009. 99f. Dissertação (Mestrado em fármacos e medicamentos) - Universidade de São Paulo, São Paulo. 2009.

TAMJIDI, F.; SHAHEDI, M.; VARSHOSAZ, J.; NASIRPOUR, A. Nanostructured lipid carriers (NLC): A potential delivery system for bioactive food molecules. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 19, p. 29–43, 2013.

TEIXEIRA, M. **Estudo dos compostos fenólicos e capacidade antioxidante de subprodutos do processo de vinificação**. 2014. 234f. Tese (Doutorado em de Ciência de alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, 2014.

TELIS, V.R.N; MARTINEZ-NAVARRETE, N. Collapse and color changes in grapefruit juice powder as affected by water activity, glass transition and addition of carbohydrate polymers. **Food Biophysics**, v. 43, p. 44 -751, 2009.

TOLUN, A; ALTINTAS, Z.; ARTIK, N. Microencapsulation of grape polyphenols using maltodextrin and gum arabic as two alternative coating materials: Development and characterization. **Journal of Trends in Food Science & Technology**, v. 63, p. 91-102, 2017.

TONON, R. V. **Secagem por atomização do suco de açaí: influência das variáveis de processo, qualidade e estabilidade do produto Matodextraina**. 2009. 121f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de alimentos), Universidade Estadual de campinas-UNICAMP, Brasil, 2009.

TONON, R. V.; BRABET, C.; HUBINGER, M. D. Anthocyanin stability and antioxidant activity of Spray-dried açaí (*Euterpe oleracea Mart.*) juice produced with different carrier agents. **Food Research International**, v. 43, n. 3, p. 907–914, 2010.

TOSCANO, G.; RIVA, G.; DUCA, D.; PEDRETTI, E. F.; CORINALDESI, F.; ROSSINI, G. Analysis of the characteristics of the residues of the wine production chain finalized to their industrial and energy recovery. **Biomass and Bioenergy**, v. 55, p. 260-267, 2013.

TSENG, A.; ZHAO, Y. Wine grape pomace as antioxidant dietary fibre for enhancing nutritional value and improving storability of yogurt and salad dressing. **Food Chemistry**, v. 138, p. 356–365, 2013.

URANO, F.; CALFON, M.; YONEDA, T.; YUN, C.; KIRALY, M.; CLARK, S. G.; RON, D. A survival pathway for *Caenorhabditis elegans* with a blocked unfolded protein response. **J. Cell Biol.**, v. 158, p. 639-646, 2002.

VALDEMARRA, J.; WILDE, P.; MACIERZANKA, A.; MACKIE, A. The role of bile salts in digestion. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 165, p. 36-46, 2011.

VAN, J. M.; HEKIMI, S. Reactive oxygen species and aging in *Caenorhabditis elegans*: causal or casual relationship. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 13, n. 12, p. 1911–1953, 2010.

VENTURINI, C. G.; JÄGER, E.; OLIVEIRA, C. P.; BERNARDI, A.; BATTASTINI, A. M.; GUTERRES, S. B.; POHLMANN, A. Formulation of lipid core nanocapsules. **Colloids. and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 375, n. 1 -3, p. 200-208, 2011.

VILLANOVA, J. C. O.; ORÉFICE, R. L.; CUNHA, A. S. Aplicações farmacêuticas de polímeros. **Polímeros**, v. 20, n. 1, p. 51-64, 2010.

VILLELA-CASTREJON, J.; ACOSTA-ESTRADA, BA; GUTIERREZ-URIBE JA. Microencapsulation of Corn Wastewater (Nejayote) Phytochemicals by Spray Drying and Their Release Under Simulated Gastrointestinal Digestion. **Journal Food Science**, v. 82, n. 7, p. 1726-1734, 2017.

VITRAC, X.; BORNET, A.; VANDERLINDE, R.; VALLS, J.; RICHARD, T.; DELAUNAY, J.; MERILLON, J.; TEISSEDE, P. Determination of stilbenes (δ -viniferin, *trans*-astrin, *trans*-piceid, *cis* and *trans*-resveratrol, ϵ -viniferin) in Brazilian wines. **J. Agric. Food Chemistry**, v. 53, p. 5664-5669, 2005.

VOLP, A. C. P.; RENHE, I. R. T.; BARRA, K.; STRINGUETA, P. C. Flavonóides antocianinas: características e propriedades na nutrição e saúde. **Revista Brasileira Nutrição Clínica**. v. 23, n. 2, p. 141-149, 2008.

WALCZAK, A.; FOKKINK, R.; PETERS, R.; TROMP, P.; HERRERA-RIVERA, Z.; RIETJENS, I. Behavior of silver nanoparticles and silver ions in an in vitro human gastrointestinal digestion model. **Nanotoxicology**, v. 7, n. 7, p. 1198-1210, 2013.

WANG, S.; AMIGO-BENAVENT, M.; MATEOS, R.; BRAVO, L.; SARRIÁ, B. Effects of in vitro digestion and storage on the phenolic content and antioxidant capacity of a red grape pomace. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 68, n. 2, p. 188-200, 2016.

WANG, W.; XU, S. Degradation kinetics of anthocyanins in blackberry juice and concentrate. **Journal of Food Engineering**, v. 82, p. 271–275, 2007.

WANG, Y. J.; WANG, L. Structures and properties of commercial maltodextrins from corn, potato and Rice starches. **Starch-Starke**, v.52, p. 296-304, 2000.

WILLIAMSON, G.; MANACH, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81 p. 243S–245S, 2005.

WILSON, N.; SHAH, N. P. Microencapsulation of vitamins. **ASEAN Food Journal**, v. 14, n. 1, p. 1-14, 2007.

XIA, E. Q.; DENG, G. F.; GUO, Y. J.; LI, H. B. Biological Activities of Polyphenols from Grapes. **Int. J. Moleculas Science**, v. 11, p. 622-646, 2010.

XIANG, L.; XIAO, L.; WANG, Y.; LI, H.; HUANG, Z.; HE, X. Health benefits of wine: don't expect resveratrol too much. **Food Chemistry**, v.156, n. 1, p. 2582–63, 2014.

XU, C.; ZHANG, Y.; CAO, L.; LU, J. Phenolic compounds and antioxidant properties of different grape cultivars grown in China. **Food Chemistry**, v. 119, p. 1557-1565, 2010.

YANG, J.; MARTINSON, T.; LIU, R. Phytochemical profiles and antioxidant activities of wine grapes. **Food Chemistry**, v. 116, p. 332-339, 2009.

YOUSEFI, S.; EMAM-DJOMEH, Z.; MOUSAVI, S. Effect of carrier type and spray drying on the physicochemical properties of powdered and reconstituted pomegranate juice (*Punica Granatum* L.). **Journal of food science and technology**, v. 48, n. 6, p. 677-684, 2011.

YOU-TUNG, L.; CHENG-CHENG, P.; SHWU-TZY, W.; CHI-YUE, C. Effect of Different Germination Conditions on Antioxidative Properties and Bioactive Compounds of Germinated Brown Rice. **Journal Bio Med Research International**, v. 2015, p. 1-10, 2015.

ZHANG, L.; JIE, G.; ZHANG, J.; ZHAO, B. Significant longevity-extending effects of EGCG on *Caenorhabditis elegans* under stress. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 46, p. 414–421, 2009.

ZIELINSKI, H.; KOZLOWSKA, H. Antioxidant activity and total phenolics in selected cereal grains and their different morphological fractions. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 48, p. 2008-2016, 2000.

ANEXO I

Tabela 1 - Valores de digestão *in vitro* das nanoesferas com relação a compostos fenólicos e capacidade antioxidante dos extratos de resíduos da vinificação.

(T ₂)					
Análises	Nanocápsula	Boca	Estômago	Intesino delgado	Intestino grosso
Fenólicos totais	4530,86±0,35 ^a	3936,63±3,48 ^a	3191,32±2,28 ^a	1634,15±1,64 ^a	1556,56±2,85 ^a
Flavonóides					
totais	29,55±1,30 ^a	21,58±3,86 ^a	21,26±0,18 ^a	9,35±0,19 ^a	8,53±0,19 ^a
DPPH	665,55±2,96 ^a	511,44±0,91 ^a	498,39±0,66 ^a	268,15±0,42 ^a	270,49±0,73 ^a
ABTS	1850,19±2,12 ^a	1845,24±9,81 ^a	1597,22±8,28 ^a	186,34±9,04 ^a	499,73±9,14 ^a
Poder redutor	1,565±0,021 ^a	0,769±0,022 ^a	0,764±0,029 ^a	0,554±0,042 ^a	0,583±0,017 ^a
Resveratrol	0,538±0,007 ^a	0,131±0,002 ^a	0,104±,03E-05 ^a	0	0
(T ₉)					
	Nanocápsula	Boca	Estômago	Intesino delgado	Intestino grosso
Fenólicos totais	2354,55±0,54 ^b	429,39±2,85 ^b	261,00±1,64 ^b	978,01±2,63 ^b	911,47±3,48 ^b
Flavonóides					
totais	13,93±0,97 ^b	13,25±0,36 ^b	13,88±0,18 ^b	8,17±0,11 ^b	7,73±0,19 ^b
DPPH	359,16±3,37 ^b	349,22±0,39 ^b	351,02±0,22 ^b	86,01±0,93 ^b	36,08±0,51 ^b
ABTS	497,91±2,76 ^b	493,10±0,42 ^b	369,82±2,44 ^b	213,90±0,19 ^b	458,94±1,07 ^b
Poder redutor	0,768±0,006 ^b	0,538±0,017 ^b	0,478±0,084 ^b	0,412±0,027 ^a	0,411±0,017 ^a
Resveratrol	0,271±0,004 ^a	0,132±4,4E-04 ^a	0,131±9,2E-06 ^b	0	0

MD; Malto Dextrina, ExS: Extrato de Shiraz, ExM: Extrato de Merlot. Letras minúsculas nas colunas comparadas entre T₂ e T₉, Letras minúsculas iguais entre os extratos indicam que há diferença estatística entre as amostras.

ANEXO II

Tabela 1 – Dados experimentais para construir a curva padrão dos fenólicos totais

ug/mL	μ L Sol. Mae (ac. G.)	Metanol uL	ABS (750)			Promedio ABS (750nm)	ABS
			R1	R2	R3		
0,004	2	998	0,069	0,079	0,079	0,076	0,020
0,008	4	996	0,082	0,098	0,098	0,093	0,037
0,016	8	992	0,138	0,137	0,137	0,137	0,081
0,03	15	985	0,193	0,193	0,193	0,193	0,139
0,04	20	980	0,2	0,2	0,2	0,200	0,195
0,06	30	970	0,203	0,204	0,204	0,2037	0,199

Tabela 2 – Dados experimentais para construir a curva padrão dos flavonóides totais

No	Conc. (mg/mL)	Volume (uL)	Metanol (uL)	TOTAL (uL)	ABS (510 nm)			Promedio
					R1	R2	R3	
1	0,006	20	980	1000	0,061	0,059	0,065	0,062
2	0,012	40	960	1000	0,117	0,119	0,116	0,117
3	0,018	60	940	1000	0,175	0,172	0,178	0,175
4	0,024	80	920	1000	0,223	0,234	0,237	0,231
5	0,03	100	900	1000	0,286	0,292	0,297	0,292
6	0,0525	175	825	1000	0,498	0,497	0,495	0,497

ANEXO III

Tabela 1 – Dados experimentais para construir a curva padrão da atividade antioxidante pelo método DPPH.

Micro Molar uM	Sol. Padrão uL	Etanol uL	Vol. total uL	ABS (515 nm)				ABS Promedio	Decrec e ABS	Corrected decrece ABS
				R1	R2	R3	R4			
0	0	1000	1000	1,006	1,041	1,044	1,044	1,0430	0,0610	0,0000
80	40	960	1000	0,942	0,938	0,929	0,936	0,9343	0,1697	0,1087
160	80	920	1000	0,855	0,855	0,855	0,855	0,8550	0,2490	0,1880
240	120	880	1000	0,789	0,766	0,759	0,758	0,7610	0,3430	0,2820
320	160	840	1000	0,668	0,672	0,669	0,669	0,6700	0,4340	0,3730
400	200	800	1000	0,526	0,567	0,568	0,565	0,5667	0,5373	0,4763
600	300	700	1000	0,398	0,321	0,325	0,309	0,3183	0,7857	0,7247

Sol.: solução, Etnol: Etanol

Tabela 2 - Dados experimentais para construir a curva padrão da atividade antioxidante pelo método ABTS.

Micro Molar uM	Sol. Padrão uL	Etanol uL	Volum e total uL	ABS (734 nm)			Promedi o	Decrece ABS	Corrigido decrece ABS
				R1	R2	R3			
0	0	1000	1000	0,678	0,678	0,678	0,678	0,0220	0,000
100	50	950	1000	0,654	0,653	0,657	0,655	0,0453	0,023
500	250	750	1000	0,563	0,552	0,548	0,554	0,1457	0,124
1000	500	500	1000	0,454	0,45	0,45	0,451	0,2487	0,227
1500	750	250	1000	0,335	0,273	0,279	0,296	0,4043	0,382
2000	1000	0	1000	0,206	0,152	0,147	0,168	0,5317	0,510

Tabela 3 - Dados experimentais para construir a curva padrão do resveratrol.

mg/mL	μL Sol. Mae (ac. G.)	Metanol uL	Promedio ABS				ABS (308 nm)	ABS (308 nm)
			R1 (ABS)	R2 (ABS)	R3 (ABS)			
0	0	1000	0,056	0,056	0,056		0,056	0,000
0,001	1	999	0,069	0,079	0,079		0,076	0,020
0,003	3	997	0,082	0,098	0,098		0,093	0,037
0,005	5	995	0,138	0,141	0,138		0,139	0,083
0,008	8	992	0,2	0,222	0,2		0,207	0,151
0,01	10	990	0,323	0,333	0,313		0,323	0,267

ANEXO IV

Tabela 1 - Dados experimentais da fluorescência líquida nos *C. elegans*.

Amostra	T	F. Liq.	Amostra	T	F. Liq.	Amostra	T	F. Liq.	Amostra	T	F. Liq.
A_1	5	476	A_2	5	504	A_3	5	465	A_4	5	463
A_1	30	594	A_2	30	620	A_3	30	587	A_4	30	590
A_1	60	722	A_2	60	825	A_3	60	757	A_4	60	788
A_1	90	1120	A_2	90	1121	A_3	90	1051	A_4	90	1052
A_1	120	1613	A_2	120	1516	A_3	120	1562	A_4	120	1470
B_1	5	1320	B_2	5	1372	B_3	5	1278	B_4	5	1293
B_1	30	1595	B_2	30	1607	B_3	30	1662	B_4	30	1699
B_1	60	2204	B_2	60	2040	B_3	60	2064	B_4	60	2083
B_1	90	2865	B_2	90	2883	B_3	90	2778	B_4	90	2793
B_1	120	3935	B_2	120	3755	B_3	120	3713	B_4	120	3792
C_1	5	1676	C_2	5	1600	C_3	5	1673	C_4	5	1560
C_1	30	2033	C_2	30	2010	C_3	30	1988	C_4	30	2015
C_1	60	2534	C_2	60	2555	C_3	60	2563	C_4	60	2562
C_1	90	3454	C_2	90	3480	C_3	90	3486	C_4	90	3337
C_1	120	4506	C_2	120	4467	C_3	120	4378	C_4	120	4346
D_1	5	-210	D_2	5	-214	D_3	5	-230	D_4	5	-201
D_1	30	-141	D_2	30	-180	D_3	30	-152	D_4	30	-151
D_1	60	-81	D_2	60	-141	D_3	60	-140	D_4	60	-133
D_1	90	75	D_2	90	21	D_3	90	89	D_4	90	6
D_1	120	282	D_2	120	238	D_3	120	229	D_4	120	253
E_1	5	-400	E_2	5	-457	E_3	5	-402	A_4	5	-430
E_1	30	-316	E_2	30	-373	E_3	30	-318	E_4	30	-336
E_1	60	-193	E_2	60	-195	E_3	60	-152	E_4	60	-198
E_1	90	-61	E_2	90	-43	E_3	90	20	E_4	90	-75
E_1	120	182	E_2	120	223	E_3	120	245	E_4	120	216
F_1	5	-645	F_2	5	-690	F_3	5	-710	F_4	5	-662
F_1	30	-558	F_2	30	-603	F_3	30	-569	F_4	30	-531
F_1	60	-422	F_2	60	-519	F_3	60	-463	F_4	60	-481
F_1	90	-275	F_2	90	-344	F_3	90	-293	F_4	90	-270
F_1	120	-39	F_2	120	-110	F_3	120	-109	F_4	120	-61
CONTROLE											
CTRL_1	5	69	CTRL_2	5	57	CTRL_3	5	8			
CTRL_1	30	38	CTRL_2	30	39	CTRL_3	30	88			
CTRL_1	60	34	CTRL_2	60	32	CTRL_3	60	71			
CTRL_1	90	148	CTRL_2	90	113	CTRL_3	90	118			
CTRL_1	120	347	CTRL_2	120	286	CTRL_3	120	267			

Tabela 2 – Proporções de sobrevivência dos *C. elegans*

Dias	AMOSTRAS						Controle
	A	B	C	D	E	F	
0,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000
1,000							
2,000							
3,000							
4,000							
5,000							
6,000							
7,000							
8,000							94,44444
9,000							
10,000			95,2381				
11,000	90,47619					95,2381	
12,000	85,71429			97,22222			88,88889
13,000		92,30769					83,33334
14,000	71,42857		85,71429	94,44444			77,77778
15,000	57,14286		80,95238		91,66666	90,47619	72,22222
16,000	47,61905	76,92308	71,42857	91,66666			61,11111
17,000	42,85714	69,23077		83,33334		80,95238	55,55556
18,000	38,09524	46,15385	61,90476	80,55556	79,16666	76,19048	50,000
19,000		38,46154	52,38095	72,22222	70,83334	66,66666	22,22222
20,000	33,33333	15,38461		61,11111	66,66666	57,14286	
21,000	19,04762		42,85714	58,33333	62,500		16,66667
22,000	9,523809	7,692307	33,33333	55,55556	45,83333	52,38095	11,11111
23,000			23,80952	50,000	41,66667	42,85714	5,555555
24,000	4,761905		9,523809	47,22222	37,500	28,57143	
25,000	0,000	0,000	4,761905	33,33333	20,83333		
26,000			0,000	30,55556		23,80952	
27,000					12,500	19,04762	0,000
28,000				27,77778		14,28571	
29,000				16,66667	4,166667	4,761905	
30,000				11,11111		0,000	
31,000							
32,000				5,555555			
33,000				2,777778			
34,000					0,000		
35,000							
36,000							
37,000				0,000			