

Daiane Andressa Faoro

**DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÕES CONTENDO
COMPOSTOS FENÓLICOS DO BAGAÇO DA UVA PARA
APLICAÇÃO CUTÂNEA VISANDO ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Farmácia da
Universidade Federal de Santa Catarina
para a obtenção do Grau de Mestre em
Farmácia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Elenara Maria
Teixeira Lemos Senna

Florianópolis
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Faoro , Daiane Andressa
DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÕES CONTENDO
COMPOSTOS FENÓLICOS DO BAGAÇO DE UVA PARA APLICAÇÃO
CUTÂNEA VISANDO ATIVIDADE ANTIOXIDANTE / Daiane
Andressa Faoro ; orientadora, Elenara Maria
Teixeira Lemos Senna, 2019.
118 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis,
2019.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Bagaço de uva. 3. Compostos
fenólicos. 4. Nanoemulsão. 5. Atividade
antioxidante. I. Lemos Senna, Elenara Maria
Teixeira . II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III.
Título.

Daiane Andressa Faoro

**DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÕES CONTENDO
COMPOSTOS FENÓLICOS DO BAGAÇO DA UVA PARA
APLICAÇÃO CUTÂNEA VISANDO ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Farmácia e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Farmácia

Florianópolis, 03 de junho de 2019.

Prof.^a Dr.^a Elenara Maria Teixeira Lemos Senna
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Elenara Maria Teixeira Lemos Senna
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof.^a Dr.^a Jane Mara Block
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof.^a Dr.^a Bianca Ramos Pezzini
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Dr.^a Débora Fretes Argenta
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Este trabalho é dedicado aos meus pais por terem me preparado para os desafios da vida, pelo incentivo e apoio incondicional na busca pelo conhecimento.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo incentivo, apoio e compreensão em todos os momentos da minha vida, pelo esforço e abdicção para realização dos meus sonhos. Obrigada por acreditarem em mim! Aos meus familiares, meu irmão Daniel, minhas tias, tios, avó, padrinho e primos pelo carinho, incentivo e compreensão nos momentos de ausência. Em especial a minha vó Maria (*in memoriam*) que partiu deste plano físico no início dessa minha trajetória, deixando muitas saudades. Seus abraços apertados e sua força jamais serão esquecidos!

À professora Elenara, pela orientação, receptividade, ensinamentos e dedicação na realização deste trabalho. Aos demais professores do PGFAR com os quais tive contato, obrigada pela contribuição nesta etapa e pelo conhecimento compartilhado.

Aos “nanocolegas” do Laboratório de Farmacotécnica da UFSC, por compartilharem comigo dos momentos de alegria e dificuldade, pelo convívio diário e troca de experiências. Com certeza levo um aprendizado de uma conversa com cada um de vocês! Um agradecimento especial às doutorandas Carine, Edna e Mariana que estiveram sempre de ouvidos abertos para receber minhas dúvidas e divagações (que não foram poucas), sentirei falta dos nossos papos cabeça na mesa do café! Aos colegas, funcionários e técnicos dos demais laboratórios e setores da UFSC pela disponibilidade e ensinamentos.

Aos professores da Universidade Paranaense, Euclides e Juliana e à mestre Adriana Kleinubing por despertarem a curiosidade científica ao longo da graduação, principalmente em relação à nanotecnologia e me incentivarem na busca das respostas. Essa dissertação é uma delas e sou grata a vocês!

Às minhas amigas de Santa Helena, Carol, Renata e Sinara pela amizade de longa data que apesar da distância nunca diminuiu o carinho, por sempre torcerem pelas minhas conquistas e estenderem a mão quando necessário. Ao meu eterno melhor grupo de estágio, João, Juliana, Mateus e Sara pelo apoio, amizade e por torcerem por mim sempre. Ao meu colega de graduação Jeferson que mesmo longe sempre estendeu o ombro amigo nos dias que o fardo estava mais pesado, por me ajudar pensar com mais clareza na hora de tomar decisões.

À minha amiga e grande incentivadora Tati, acredito muito que Deus une pessoas por um propósito e com certeza nossos caminhos não se cruzaram por acaso! Obrigada por me acolher em Floripa na busca por esse objetivo, por acreditar em mim e pelas palavras sempre positivas. Às minhas amigas de Floripa pela compreensão e apoio, a Fer por estar

sempre disposta a ajudar e pelo auxílio com HPLC; Ste que dividiu além de um apartamento todas as minhas angústias e incertezas ao longo desses dois anos; Tati Cristofolini pela amizade e incentivo; Marcela por muitas vezes ouvir os desabafos e compartilhar as experiências da vida acadêmica.

Aos antigos colegas de trabalho da FPP Trindade que respeitaram minha escolha pelo Mestrado, pelo incentivo e torcida o meu muito obrigada! Aos meus atuais colegas do LACEN/SC, pela compreensão e palavras de apoio na reta final.

À UFSC, ao PGFAR e à CAPES, por possibilitarem a realização deste trabalho através de apoio financeiro e infraestrutura.

À todos que mesmo não citados, colaboraram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

“Em alguns momentos, vai faltar combustível para alimentar o entusiasmo, mas acredite, o que determina o seu destino é a maneira como você escolhe reagir aos desafios impostos pela vida. ”
(SANTANA, 2019)

RESUMO

Substâncias antioxidantes como os polifenóis têm sido usadas para reduzir os efeitos deletérios da radiação solar sobre a pele. Tais compostos são encontrados em quantidades significativas no bagaço de uva, um resíduo que pode ser empregado vantajosamente para obtenção de formulações farmacêuticas com propriedades antioxidantes. Neste trabalho, nanoemulsões contendo compostos fenólicos do bagaço da uva foram desenvolvidas como estratégia para a liberação tópica de antioxidantes. Inicialmente, soluções extrativas foram obtidas a partir do bagaço de uva sem secagem (SE_{BSS}), submetido à secagem em estufa (SE_{BSE}), ou liofilizado (SE_{BL}), e caracterizadas quanto ao teor de compostos fenólicos totais, resíduo seco e atividade antioxidante. A partir destes resultados, a SE_{BL} foi selecionada para a continuidade do trabalho e uma fração acetato de etila (FAE) foi obtida a partir desta solução extrativa. A FAE foi caracterizada quanto ao teor de compostos fenólicos totais e quanto ao teor dos compostos isoquercitrina e resveratrol, selecionados como marcadores químicos, após análise da fração por metodologia analítica de CLAE-DAD-ESI-MS/MS validada. Para o desenvolvimento das nanoemulsões, ensaios preliminares foram realizados utilizando triglicerídeos de cadeia média, óleo de rícino ou óleo de semente de uva, variando a concentração de lecitina de soja e Tween 80) e o volume da fase orgânica. As nanoemulsões foram preparadas pela técnica de emulsificação espontânea com ou sem agitação ultrassônica. As nanoemulsões foram caracterizadas quanto ao tamanho da gota, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta. A partir destes resultados, as formulações que resultaram em menores tamanho de gotícula e PDI foram selecionadas para a incorporação da FAE, resultando em três formulações: NE-FAE_{TCM}, NE-FAE_{OR} e NE-FAE_{OSU}. As formulações NE-FAE_{TCM} e NE-FAE_{OR} apresentaram menor tamanho de partículas e índice de polidispersão, bem como maior estabilidade frente aos fenômenos de separação de fases, em estudos de estabilidade acelerada. As três formulações foram caracterizadas quanto ao teor de fenóis totais, de isoquercitrina e resveratrol, não apresentando diferenças nas concentrações destes compostos fenólicos. No entanto, a eficiência de encapsulação para a isoquercitrina foi menor em relação ao resveratrol, provavelmente devido à menor lipofilia deste composto. As nanoemulsões contendo a FAE apresentaram atividade antioxidante significativa pelos métodos DPPH e FRAP. Estudos de permeação cutânea foram realizados com NE-FAE_{OR} e FAE, em modelo biocompartimental de células de Franz, usando pele de orelha suína como modelo de membrana. Nestes estudos foi possível quantificar a isoquercitrina retida na pele (epiderme e derme), mas não no estrato córneo e permeado. Considerando os resultados obtidos, a obtenção de nanoemulsões contendo compostos fenólicos do bagaço de uva mostrou ser viável e promissora para utilização em produtos dermocosméticos visando a atividade antioxidante.

Palavras-chave: Bagaço de uva. Compostos fenólicos. Nanoemulsão. Atividade antioxidante.

ABSTRACT

Antioxidant substances like polyphenols have been used to reduce the deleterious effects of solar radiation on the skin. These compounds are found in significant quantities in grape pomace, a residue that can be advantageously employed to obtain pharmaceutical formulations with antioxidant properties. In this work, nanoemulsions containing phenolic compounds from grape pomace were developed as a strategy for the topical release of antioxidants. Initially, extractive solutions were obtained from grape pomace without drying (ES_{GPWD}), kiln dried (ES_{GPKD}), or lyophilized (ES_{GPL}), and characterized by their total phenolic compound content, dry residue and antioxidant activity. From these results, SE_{GPL} was selected for continuity of work and an ethyl acetate fraction (EAF) was obtained from this extractive solution. The EAF was characterized by the content of total phenolic compounds and the content of isoquercitrin and resveratrol compounds, selected as chemical markers, after analysis of the fraction by validated HPLC-PDA-ESI-MS / MS analytical methodology. For the development of nanoemulsions, preliminary assays were performed using medium chain triglycerides, castor oil or grape seed oil, varying the concentration of soybean lecithin and Tween 80 and the volume of the organic phase. Nanoemulsions were prepared by spontaneous emulsification technique with or without ultrasonic agitation. Nanoemulsions were characterized by droplet size, polydispersion index (PDI) and zeta potential. From these results, formulations that resulted in smaller droplet size and PDI were selected for EAF incorporation, resulting in three formulations: NE-EAF_{MCT}, NE-EAF_{CO} and NE-EAF_{GSO}. The formulations NE-EAF_{MCT} and NE-EAF_{CO} presented smaller particle size and polydispersion index, as well as greater stability in relation to phase separation phenomena in accelerated stability studies. The three formulations were characterized for the total phenolic content, isoquercitrin and resveratrol, showing no differences in the concentrations of these phenolic compounds. However, the encapsulation efficiency for isoquercitrin was lower than resveratrol, probably due to the lower lipophilia of this compound. The nanoemulsions containing EAF showed significant antioxidant activity by DPPH and FRAP methods. Skin permeation studies were performed with NE-EAF_{CO} and EAF, in a biocompartmental Franz cell model, using porcine ear skin as a membrane model. In these studies was possible to quantify the isoquercitrin retained in the skin (epidermis and dermis), but not in the stratum corneum and permeate. Considering the results obtained, the obtaining of nanoemulsions containing phenolic compounds from grape pomace showed to be viable and promising for use in dermocosmetic products aiming antioxidant activity.

Keywords: Grape pomace. Nanoemulsions. Phenolic compounds. Antioxidant activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da estrutura da pele.	33
Figura 2 - Redução do oxigênio via transferência de um e quatro elétrons.	37
Figura 3 – Exemplos das formas aglicona (a) e glicosilada (b) de polifenóis. Na figura (a) quercetina e (b) rutina.	40
Figura 4 - Exemplos dos principais grupos de compostos fenólicos.	40
Figura 5 - Bagaço de uva (<i>Vitis vinífera</i> L.).	43
Figura 6 - Principais compostos fenólicos encontrados no bagaço de uva.	44
Figura 7 - Esquema de nanoemulsão do tipo óleo em água (o/a).	45
Figura 8 - Representação esquemática da célula de difusão de Franz...	50
Figura 9 - Representação esquemática da separação do estrato córneo pela técnica de tape <i>stripping</i>	51
Figura 10 - Interação proposta entre o sal de diazônio Fast Blue BB e o ácido gálico.	74
Figura 11- Curva de calibração do ácido gálico para determinação de compostos fenólicos totais pelo método Fast Blue BB.	75
Figura 12 - Valores de EC50 obtidos para as soluções extrativas e ácido gálico. Na figura, letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).	77
Figura 13 - Cromatograma obtido no desenvolvimento do método analítico para identificação e quantificação dos compostos fenólicos na FAE com detecção a 255 nm (a) e 305 nm (b).	80
Figura 14 - Curva de calibração da isoquercitrina.	83
Figura 15 - Curva de calibração do resveratrol.	83
Figura 16 - Imagens obtidas por MET das nanoemulsões contendo a FAE.	90
Figura 17 – Resultados obtidos para tamanho de gotícula (a) na avaliação da estabilidade física das nanoemulsões contendo a FAE na temperatura de 25 °C (TA) e 4 °C (GE) após 0, 7, 15 e 30 dias de armazenamento.	93
Figura 18 - Resultados obtidos para índice de polidispersão (b) na avaliação da estabilidade física das nanoemulsões contendo a FAE na temperatura de 25 °C (TA) e 4 °C (GE) após 0, 7, 15 e 30 dias de armazenamento.	94
Figura 19 - Resultados obtidos para potencial zeta (c) na avaliação da estabilidade física das nanoemulsões contendo a FAE na temperatura de 25 °C (TA) e 4 °C (GE) após 0, 7, 15 e 30 dias de armazenamento.	94

Figura 20 - Teor de compostos fenólicos totais nas nanoemulsões após 0, 7, 15 e 30 dias de armazenamento a temperatura de 25 °C (TA) e 4 °C (GE).	95
Figura 21 - Gráficos de transmitância <i>versus</i> posição da cubeta por tempo obtidos após centrifugação das nanoemulsões brancas e contendo a FAE.	96
Figura 22 - Índice de instabilidade das nanoemulsões brancas e contendo a FAE. No gráfico, letras diferentes apresentam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).	97
Figura 23 - Atividade antioxidante da FAE e das nanoemulsões contendo a FAE pelo método DPPH. No gráfico, letras diferentes indicam diferença estaticamente significante ($p < 0,05$).	98
Figura 24 – Curva de calibração do ácido gálico para determinação da atividade antioxidante pelo método FRAP.	99
Figura 25 - Atividade antioxidante das NE-FAE e FAE pelo método FRAP. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$).	100
Figura 26 - Curva de calibração de isoquercitrina para o experimento de retenção cutânea.	102
Figura 27 - Cromatograma obtido no experimento de retenção cutânea da nanoemulsão branca.	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições utilizadas no gradiente de eluição do método cromatográfico.	60
Tabela 2 - Composição das nanoemulsões contendo a fração acetato de etila (NE-FAE) do bagaço de uva.	63
Tabela 3 - Composição das nanoemulsões brancas (NE _B).	64
Tabela 4 - Resíduo seco, teor de compostos fenólicos totais e antocianinas monoméricas totais das soluções extrativas obtidas a partir do bagaço de uva.	73
Tabela 5 - Teores de fenóis totais e de antocianinas monoméricas totais obtidos para a SE _{BL} e FAE.	78
Tabela 6 - Identificação de compostos fenólicos na FAE com base no espectro de massas e injeção de padrões.	81
Tabela 7 - Limites de detecção e quantificação do isoquercitrina e resveratrol.	84
Tabela 8 - Resultados obtidos na avaliação de repetibilidade do método analítico para quantificação de isoquercitrina e resveratrol na FAE.	85
Tabela 9 – Resultados obtidos na avaliação da precisão intermediária do método analítico para quantificação de isoquercitrina e resveratrol na FAE.	85
Tabela 10 – Resultados obtidos na avaliação da exatidão do método analítico para quantificação da isoquercitrina e resveratrol na FAE.	86
Tabela 11 - Caracterização físico-químicas das nanoemulsões brancas (NE _B) quanto ao tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta e pH.	87
Tabela 12 - Caracterização físico-química das nanoemulsões contendo a fração acetato de etila (NE-FAE) quanto ao tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta e pH.	89
Tabela 13 - Teor e eficiência de encapsulação de compostos fenólicos totais das nanoemulsões.	91
Tabela 14 - Índice de pureza dos picos cromatográficos de isoquercitrina e resveratrol.	92
Tabela 15 - Teor e eficiência de encapsulação dos marcadores químicos isoquercitrina e resveratrol nas nanoemulsões.	92
Tabela 16 - Retenção cutânea de isoquercitrina após 8 horas de experimento em células de Franz.	103

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1	55
Equação 2	56
Equação 3	58
Equação 4	58
Equação 5	58
Equação 6	62
Equação 7	62
Equação 8	68

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACN - Acetonitrila
ANOVA – Análise de variância
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
DAD – Detector de arranjo de diodos
DLS – Espalhamento de luz dinâmico
DMSO – Dimetil Sulfóxido
DP – Desvio padrão
DPPH – 2,2 – Difetil-1-Picril-hidrazila
DPR – Desvio padrão relativo
EC₅₀ – Concentração necessária para reduzir 50% do radical DPPH
EE – Eficiência de encapsulação
ERRO/ERN – Espécies reativas de oxigênio/ nitrogênio
ESI – Ionização eletrospray
FAE – Fração acetato de etila do bagaço de uva
GE – Geladeira
ICH – Conferência Internacional de Harmonização
ISSO - Isoquercitrina
LC – Cromatografia líquida
LD – Limite de detecção
LQ – Limite de quantificação
MET – Microscopia eletrônica de transmissão
NE – Nanoemulsão
NEBR_{OR} – Nanoemulsão branca contendo óleo de rícino
NEFAE_{OR} – Nanoemulsão contendo óleo de rícino encapsulando a fração acetato de etila do bagaço de uva
NEBR_{OSU} – Nanoemulsão branca contendo óleo de semente de uva
NEFAE_{OSU} – Nanoemulsão contendo óleo de semente de uva encapsulando a fração acetato de etila do bagaço de uva
NEBR_{TCM} – Nanoemulsão branca contendo triglicerídeos de cadeia média
NEFAE_{TCM} – Nanoemulsão contendo triglicerídeos de cadeia média encapsulando a fração acetato de etila do bagaço de uva
O/A – Óleo em água
OR – Óleo de rícino
OSU – Óleo de semente de uva
IPD – Índice de polidispersão
pH – Potencial hidrogeniônico
RES – Resveratrol
RPM – rotações por minuto
SE – solução extrativa

TA – Temperatura ambiente

TCM – Triglicerídeos de cadeia média

TPTZ – 2,4,5-tris (2-piridil)-S-triazina

UFLC – Cromatografia líquida de ultra eficiência

UV/VIS – Espectrofotometria no ultravioleta/visível

λ – Comprimento de onda

EC – Estrato córneo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
1.1	OBJETIVOS.....	31
1.1.1	Objetivo geral	31
1.1.2	Objetivos específicos.....	31
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	33
2.1	A PELE	33
2.1.1	Anatomia e estrutura da pele	33
2.1.2	Envelhecimento cutâneo	34
2.1.3	Radiação solar na pele humana.....	35
2.2	RADICAIS LIVRES E ESTRESSE OXIDATIVO	36
2.3	O BALANÇO REDOX DA PELE E O USO DE ANTIOXIDANTES	38
2.3.1	Polifenóis	39
2.3.2	Métodos para determinação da capacidade antioxidante <i>in vitro</i>	41
2.4	BAGAÇO DE UVA	42
2.4.1	Composição química	43
2.4.2	Propriedades biológicas	44
2.5	NANOEMULSÕES	45
2.5.1	Preparo e caracterização das nanoemulsões O/A	46
2.6	ADMINISTRAÇÃO E LIBERAÇÃO TÓPICA CUTÂNEA DE FÁRMACOS	47
2.6.1	Aplicação tópica cutânea de nanoemulsões.....	48
2.6.2	Estudos de permeação e retenção cutânea <i>in vitro</i>	49
3	MATERIAIS E MÉTODOS	53
3.1	MATERIAIS	53
3.1.1	Matérias-primas	53
3.1.2	Solventes e Reagentes.....	53
3.1.3	Equipamentos	54
3.2	MÉTODOS.....	55
3.2.1	Obtenção, caracterização e processamento da matéria-prima	55
3.2.1.1	Obtenção do bagaço de uva.....	55
3.2.1.2	Teor de umidade do bagaço de uva	55
3.2.1.3	Secagem do bagaço de uva.....	55
3.2.2	Preparo e caracterização das soluções extrativas a partir do bagaço de uva	56

3.2.2.1	Preparo das soluções extrativas.....	56
3.2.2.2	Caracterização das soluções extrativas.....	56
3.2.2.2.1	<i>Determinação do teor de resíduo seco.....</i>	<i>56</i>
3.2.2.2.2	<i>Determinação do teor de compostos fenólicos totais.....</i>	<i>57</i>
3.2.2.2.3	<i>Determinação do teor de antocianinas totais</i>	<i>57</i>
3.2.2.3	Avaliação da atividade antioxidante	58
3.2.3	Obtenção e caracterização da fração acetato de etila a partir da solução extrativa do bagaço de uva.....	59
3.2.3.1	Obtenção da fração acetato de etila.....	59
3.2.3.2	Caracterização da fração acetato de etila	59
3.2.3.2.1	<i>Determinação do teor de compostos fenólicos totais.....</i>	<i>59</i>
3.2.3.2.2	<i>Determinação do teor de antocianinas totais</i>	<i>59</i>
3.2.4	Desenvolvimento e validação da metodologia analítica de cromatografia líquida para identificação e quantificação dos compostos fenólicos na FAE e nas nanoemulsões.....	59
3.2.4.1	Identificação dos compostos fenólicos do bagaço de uva..	59
3.2.4.1.1	<i>Instrumentação e condições cromatográficas.....</i>	<i>59</i>
3.2.4.1.1	<i>Identificação dos compostos fenólicos.....</i>	<i>60</i>
3.2.4.2	Determinação dos compostos fenólicos isoquercitrina e resveratrol por CLAE-DAD na FAE e nas nanoemulsões.....	61
3.2.4.2.1	<i>Instrumentação e condições cromatográficas.....</i>	<i>61</i>
3.2.4.2.2	<i>Validação do método analítico</i>	<i>61</i>
3.2.4.2.2.1	<i>Linearidade</i>	<i>61</i>
3.2.4.2.2.2	<i>Limites de detecção e quantificação</i>	<i>61</i>
3.2.4.2.2.3	<i>Precisão</i>	<i>62</i>
3.2.4.2.2.4	<i>Exatidão</i>	<i>62</i>
3.2.5.3.5.1	<i>Especificidade</i>	<i>62</i>
3.2.5	Desenvolvimento das nanoemulsões contendo a FAE... 62	62
3.2.5.1	Preparo das nanoemulsões brancas	62
3.2.5.2	Preparo das nanoemulsões contendo FAE	63
3.2.5.3	Caracterização físico-química das nanoemulsões	65
3.2.5.3.1	<i>Determinação do pH.....</i>	<i>65</i>
3.2.5.3.2	<i>Determinação do diâmetro médio, distribuição granulométrica e potencial zeta.....</i>	<i>65</i>
3.2.5.3.3	<i>Avaliação da morfologia das nanoemulsões.....</i>	<i>65</i>
3.2.5.3.4	<i>Determinação do teor e eficiência de encapsulação de compostos fenólicos totais nas nanoemulsões</i>	<i>65</i>
3.2.5.3.5	<i>Determinação do teor e eficiência de encapsulação de isoquercitrina e resveratrol nas nanoemulsões</i>	<i>66</i>
3.2.5.3.5.1	<i>Avaliação da especificidade do método CLAE-DAD</i>	<i>67</i>
3.2.5.4	Estudos de estabilidade das nanoemulsões	67

3.2.6	Avaliação da atividade antioxidante.....	67
3.2.6.1	<i>Método DPPH.....</i>	67
3.2.6.1	Método FRAP.....	68
3.2.7	Avaliação da permeação e retenção cutânea <i>in vitro</i> dos compostos isoquercitrina e resveratrol em modelo bicompartimental de células de Franz.....	69
3.2.7.1	Avaliação da solubilidade dos compostos fenólicos totais no meio receptor.....	69
3.2.7.2	Preparação das membranas.....	69
3.2.7.3	Cinética de permeação cutânea.....	70
3.2.7.4	Estudos de retenção cutânea.....	70
3.2.7.5	Validação do método analítico CLAE-DAD para determinação da isoquercitrina nos estudos de permeação e retenção cutânea.....	71
3.2.8	Análise estatística.....	71
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	72
4.1	CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA.....	72
4.2	CARACTERIZAÇÃO DAS SOLUÇÕES EXTRATIVAS.....	72
4.3	CARACTERIZAÇÃO DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE).....	77
4.3.1	Determinação do teor de compostos fenólicos totais e antocianinas monoméricas totais.....	77
4.4	DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA PARA IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS NA FAE E NAS NANOEMULSÕES... ..	79
4.4.1	Identificação dos compostos fenólicos.....	79
4.4.2	Validação do método analítico CLAE-DAD para determinação da isoquercitrina e resveratrol na FAE.....	82
4.4.2.1	Especificidade.....	82
4.4.2.2	Linearidade e limites de detecção e quantificação.....	82
4.4.2.3	Precisão.....	84
4.4.2.4	Exatidão.....	84
4.5	DESENVOLVIMENTO DAS NANOEMULSÕES CONTENDO A FRAÇÃO ACETATO DE ETILA OBTIDA A PARTIR DO BAGAÇO DE UVA.....	86
4.5.1	Preparação e caracterização físico-química das nanoemulsões brancas.....	86
4.5.2	Preparação e caracterização físico-química das nanoemulsões contendo FAE.....	89

4.5.3	Avaliação da morfologia das nanoemulsões.....	89
4.5.4	Determinação do teor e eficiência de encapsulação de compostos fenólicos totais nas nanoemulsões	90
4.5.5	Determinação do teor e eficiência de encapsulação do resveratrol e isoquercetrina nas nanoemulsões	91
4.5.5.1	Avaliação da especificidade do método CLAE-DAD.....	91
4.5.5.2	Determinação do teor e eficiência de encapsulação.....	92
4.5.6	Avaliação da estabilidade das nanoemulsões contendo a FAE	92
4.5.6.1	Estabilidade frente à temperatura.....	92
4.5.6.2	Estabilidade acelerada.....	95
4.6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS NANOEMULSÕES E FRAÇÃO ACETATO DE ETILA	97
4.6.1	Método DPPH.....	97
4.6.2	Método FRAP	99
4.7	AVALIAÇÃO DA PERMEACÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA <i>IN VITRO</i> DAS NANOEMULSÕES E DA FAE EM CÉLULAS DE DIFUSÃO DE FRANZ.....	100
4.7.1	Solubilidade dos compostos fenólicos totais no meio receptor	101
4.7.2	Validação do método analítico de CLAE-DAD	101
4.7.3	Estudos de retenção cutânea	103
5	CONCLUSÕES	104
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105

1 INTRODUÇÃO

A pele é a camada mais externa do corpo humano e atua como barreira protetora contra fatores ambientais, como o estresse mecânico, químico e radiação solar, além atuar como barreira à entrada de substâncias externas perigosas no organismo (ALBRECHT et al., 2019; NISKA et al., 2018). Apesar da pele possuir um sistema antioxidante endógeno complexo que atua na proteção contra danos oxidativos enzimáticos e não-enzimáticos, a exposição excessiva à radiação ultravioleta leva à sobrecarga destes mecanismos antioxidantes, sendo considerada um dos principais fatores que levam ao envelhecimento cutâneo o ao aparecimento do câncer de pele (COSTA, 2012; NICHOLS; KATIYAR, 2010; YOUNG; CLAVEAU; ROSSI, 2017). Além da utilização de filtros solares, o uso de formulações tópicas antioxidantes pode auxiliar na proteção contra a radiação solar e minimizar os efeitos deletérios da radiação ultravioleta (GALANAKIS, 2017). Os antioxidantes exógenos atuam inibindo a produção de radicais livres, interrompendo reações de auto oxidação, protegendo e regulando as defesas antioxidantes celulares, neutralizando íons pró-oxidantes metálicos e/ou inibindo enzimas pró-oxidativas, podendo assim neutralizar o estresse oxidativo (SOTO; FALQUÉ; DOMÍNGUEZ, 2015).

O processamento de alimentos a nível industrial gera uma grande quantidade de resíduos orgânicos sólidos, utilizados de forma geral para compostagem ou descartados em locais abertos, podendo gerar problemas ambientais (PANIC' et al., 2019). Os subprodutos alimentares apresentam uma rica diversidade de compostos bioativos interessantes para aplicação nas indústrias cosmética, alimentícia e farmacêutica, o que tem levado ao aumento das pesquisas e o interesse da academia pela exploração desses resíduos (OKIYAMA; NAVARRO; RODRIGUES, 2017; PRADAL et al., 2018; RODRIGUES et al., 2016; RODRIGUES; PIMENTEL; OLIVEIRA, 2015).

A uva (*Vitis vinífera* L.) é uma das frutas mais cultivadas e consumidas no mundo, e uma das fontes mais ricas em polifenóis (FRAIGE; PEREIRA-FILHO; CARRILHO, 2014; GALANAKIS, 2017). Essa fruta é amplamente consumida “in natura” ou utilizada como matéria-prima na produção de sucos, vinhos, geleias, uvas passas, entre outros produtos (PINTAC' et al., 2018). No Brasil, a uva apresenta grande importância econômica e a maior parte do cultivo é destinado à produção de vinhos de mesa e suco de uva (MELLO, 2017). Apesar da viticultura estar presente em diversos estados do país, a Região Sul (principalmente

Rio Grande do Sul e Santa Catarina) é responsável por mais de 50% da produção nacional de uvas e pela maior parte do processamento industrial, visando principalmente a elaboração de vinhos (LAZAROTTO; TAFFAREL; MONTEIRO, 2016).

Na vitivinicultura um dos principais resíduos sólidos gerados é o bagaço de uva, que consiste basicamente de uma mistura de pele e sementes, geralmente utilizado como fertilizantes ou alimentação animal (GALANAKIS, 2017; OLIVEIRA et al., 2009). A quantidade de resíduos depende da variedade da uva, processo de prensagem e da fermentação, porém, de modo geral o bagaço corresponde a cerca de 20% do peso original da fruta e é relatado que em torno de 70% do conteúdo fenólico é preservado após o seu processamento (BERES et al., 2017; SOTO; FALQUÉ; DOMÍNGUEZ, 2015).

O bagaço de uva se apresenta como uma fonte alternativa de matéria-prima para o desenvolvimento de formulações com agregado valor tecnológico ao produto, e contribuindo para a cadeia de sustentabilidade (GALANAKIS, 2017). Esse subproduto apresenta uma grande diversidade de compostos metabolicamente ativos, tais como ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos e taninos, dependendo de fatores como a origem geográfica, época de colheita, condições climáticas, processamento, técnicas de extração e cultivar (BRAHIM; GAMBIER; BROSE, 2014; CAMPOS et al., 2008; GOULA; THYMIATIS; KADERIDES, 2016). A atividade antioxidante do bagaço de uva e demais subprodutos da vinificação é extensamente relatada na literatura, entretanto existem poucos estudos abrangendo o desenvolvimento de formulações farmacêuticas a partir deste resíduo (LOULI; RAGOSSIS; MAGOULAS, 2004; MOURE et al., 2001; NEGRO; TOMMASI; MICELI, 2003; ROCKENBACH et al., 2008, 2012; RUBERTO et al., 2007; SPIGNO et al., 2013; TORRES et al., 2015).

A fim de melhorar as propriedades biofarmacêuticas de compostos aplicados topicamente, o desenvolvimento de sistemas de liberação nanoestruturados tem sido realizado, tendo em vista as diversas vantagens que apresentam em comparação aos sistemas convencionais de liberação, dentre elas: aumento da área superficial, aumento da solubilidade e estabilidade, liberação controlada de ativos, diminuição da irritação nos tecidos, proteção contra degradação, aumento da concentração dos ativos no alvo de interesse, e aumento da permeação através das camadas cutâneas, entre outras (JEPPS et al., 2013; ROBERTS et al., 2017; SOTO; FALQUÉ; DOMÍNGUEZ, 2015). Os sistemas nanoestruturados mais estudados para a aplicação cutânea de compostos ativos são as nanopartículas poliméricas e lipídicas (GOYAL et al., 2016). Dentre esses

sistemas, as nanoemulsões são relatadas como estratégia promissora para melhorar a liberação de compostos antioxidantes nas diferentes camadas da pele (MONTENEGRO et al., 2016). As nanoemulsões são sistemas heterogêneos formados por uma dispersão de gotículas de um líquido em outro líquido imiscível, estabilizadas por surfactantes e com elevada capacidade de veiculação de compostos hidrofóbicos (MCCLEMENTS; RAO, 2011). Assim, considerando os efeitos benéficos dos compostos antioxidantes presentes no bagaço de uva e o potencial de utilização deste resíduo como fonte de compostos fenólicos, este trabalho tem como objetivo desenvolver nanoemulsões contendo compostos fenólicos do bagaço de uva visando sua aplicação tópica cutânea.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Desenvolver nanoemulsões contendo compostos fenólicos do bagaço de uva para aplicação cutânea visando atividade antioxidante.

1.1.2 Objetivos específicos

- Preparar soluções extrativas pelo método de maceração a partir do bagaço de uva sem secagem ou submetido à secagem por estufa e liofilização.
- Caracterizar as soluções extrativas quanto ao resíduo seco, teor de compostos fenólicos totais, antocianinas monoméricas totais e atividade antioxidante.
- Avaliar o uso de diferentes técnicas de secagem do bagaço sobre o teor de compostos fenólicos totais.
- Obter a fração acetato de etila pelo método de partição líquido-líquido a partir da solução extrativa.
- Caracterizar a fração acetato de etila quanto ao teor de compostos fenólicos e antocianinas monoméricas totais.
- Desenvolver e validar metodologia analítica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos e espectrofotômetro de massas (CLAE-DAD-ESI-MS/MS) para identificação e quantificação dos compostos fenólicos na fração acetato de etila do bagaço de uva.
- Desenvolver nanoemulsões com e sem a fração acetato de etila do bagaço de uva utilizando triglicerídeos de cadeia média, óleo de rícino e óleo de semente de uva como fase oleosa.
- Caracterizar as nanoemulsões quanto ao tamanho das gotículas, distribuição granulométrica, potencial zeta e morfologia.
- Determinar o teor e eficiência de encapsulação de compostos fenólicos nas nanoemulsões por espectroscopia de absorção no visível e cromatografia líquida de alta eficiência.
- Avaliar a estabilidade das nanoemulsões após o armazenamento em temperatura ambiente e em geladeira;
- Avaliar a estabilidade acelerada das nanoemulsões frente aos fenômenos de separação de fases.
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* da fração acetato de etila e das nanoemulsões contendo a fração pelos métodos DPPH e FRAP.

- Avaliar a permeação e retenção cutânea *in vitro* dos compostos identificados na fração acetato de etila, após aplicação das nanoemulsões e da fração livre em modelo bicompartimental de célula de Franz.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

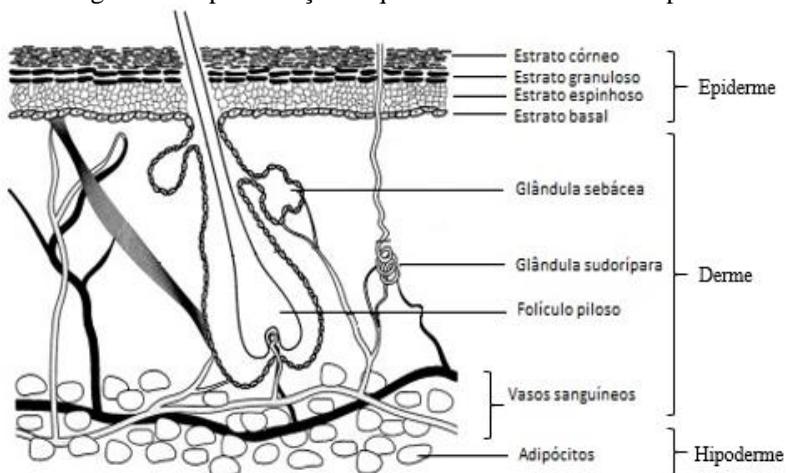
2.1 A PELE

2.1.1 Anatomia e estrutura da pele

A pele é a camada mais externa do corpo humano e atua como barreira protetora contra fatores ambientais como o estresse mecânico, químico, radiação solar, microrganismos, parasitas invasivos, além de impedir a entrada de substâncias externas perigosas (ALBRECHT et al., 2019; NISKA et al., 2018). É responsável pelo revestimento e retenção de água no corpo, evita a perda do fluido corporal e está envolvida no metabolismo de proteínas, lipídios, carboidratos e vitaminas (BOLZINGER et al., 2012; NISKA et al., 2018). Apresenta importante papel na regulação da temperatura corporal e na resposta imunológica, por apresentar células capazes de reconhecer e processar antígenos específicos iniciando a resposta inflamatória e ainda função neurossensorial, incluindo os sentidos de toque, calor e dor (NISKA et al., 2018).

Estruturalmente, a pele é composta por três camadas que possuem composição e estruturas diferentes: a epiderme, a derme e a hipoderme (Figura 1) (MATHES; RUFFNER; GRAF-HAUSNER, 2014).

Figura 1- Representação esquemática da estrutura da pele.



Fonte: adaptado de El Maghraby; Barry; Williams (2008)

A epiderme é a camada mais externa e fina da pele, composta por vários tipos de células, incluindo melanócitos, queratinócitos e células de Langerhans. Os queratinócitos da camada basal passam por divisão e em seguida se diferenciam e migram para fora, formando a camada espinhosa, depois a camada granulosa e finalmente a camada ou estrato córneo. Essa diferenciação é complexa e altera as células basais metabolicamente ativas contendo organelas típicas como mitocôndrias e ribossomos em estrato córneo, compreendendo corneócitos atenuados e anucleados dispostos em bicamadas lipídicas (AULTON; TAYLOR, 2013; NISKA et al., 2018). O estrato córneo é estruturalmente composto por corneócitos enriquecidos de proteínas (tijolos) que apresentam obstáculos à passagem da água ou de qualquer molécula, enquanto que os lipídios hidrofóbicos, organizados em estruturas lamelares rígidas (rejunte), fornecem uma barreira à prova d'água, formando a conhecida estrutura do tipo “tijolo-rejunte”, que é o maior obstáculo à permeação cutânea de fármacos (MENON, 2002).

A derme consiste em tecido conjuntivo intimamente ligado à epiderme pela membrana basal (NISKA et al., 2018). É composta por uma rede de colágeno e elastina e um gel de mucopolissacarídeo, assemelhando-se a um hidrogel. Na derme encontram-se diversas estruturas tais como glândulas sebáceas e sudoríparas, vasos sanguíneos e linfáticos, terminações nervosas bem como apêndices cutâneos (folículos cutâneos e unhas). Essa camada é extremamente vascular e participa da regulação da temperatura do corpo, auxilia no reparo de feridas, fornece oxigênio e nutrientes ao tecido e remove produtos residuais (AULTON; TAYLOR, 2013; MENON, 2002).

A hipoderme ou tecido subcutâneo é a camada mais profunda da pele e está situada abaixo da derme, tem a função de isolar o corpo e proteger contra lesões mecânicas, além de servir como reserva de energia. A hipoderme é composta basicamente de adipócitos, os quais são células que armazenam gordura e cuja espessura apresenta variações anatômicas e individuais, que refletem o estado nutricional do indivíduo (AULTON; TAYLOR, 2013; KHAVKIN, 2011).

2.1.2 Envelhecimento cutâneo

Existem dois tipos de envelhecimento aos quais a pele está submetida: intrínseco e extrínseco. O envelhecimento intrínseco é também conhecido como cronológico, geralmente tem influência genética, hormonal, e apresenta percepção lenta e significativas variações

entre populações, indivíduos da mesma etnia e em diferentes partes do corpo. O envelhecimento cutâneo intrínseco só pode ser visto em idade bem avançada e é caracterizado por uma pele sem manchas, lisa, pálida, mais seca, menos elástica e com rugas finas. Algumas alterações subcutâneas podem levar a linhas de expressão exageradas no rosto. Esse envelhecimento ocorre basicamente dentro do próprio tecido, através da diminuição de mastócitos dérmicos, fibroblastos e produção de colágeno (TOBIN, 2017). O envelhecimento extrínseco é causado por fatores ambientais como a radiação UV, tabagismo, dieta, produtos químicos, traumas entre outros. Ao contrário do envelhecimento intrínseco, de difícil intervenção, a prevenção e o tratamento de alterações relacionadas ao envelhecimento extrínseco e estrutura da pele são muito estudadas (BAUMANN, 2018).

A exposição solar excessiva e desprotegida é a maior causa de envelhecimento extrínseco, o que é visualizado principalmente no rosto, pescoço, mãos e braços. Cerca de 80% do envelhecimento da pele ocorre devido a exposição solar crônica, podendo causar queimaduras solares, inflamação, imunossupressão e dano ao tecido. As principais características de uma pele envelhecida extrinsecamente são rugas profundas, textura áspera, pele pálida, manchada e a perda de elasticidade. Os efeitos da radiação solar na pele são tão impactantes que são designados separadamente como fotoenvelhecimento (BAUMANN, 2018; TOBIN, 2017).

2.1.3 Radiação solar na pele humana

A superfície corporal é exposta à radiação solar praticamente todos os dias, contribuindo com diversos processos fisiológicos, em particular a síntese de vitamina D, essencial para o metabolismo de cálcio e fundamental para a nossa saúde (ABULMEATY, 2017; ALBRECHT et al., 2019; HOLICK, 2018). Entretanto, apesar desses benefícios a exposição excessiva e a longo prazo pode proporcionar efeitos negativos, causando eritema, dano celular e ao DNA, imunossupressão, envelhecimento precoce, podendo levar ao câncer de pele (ALBRECHT et al., 2019; KHALIL, 2018).

A radiação solar que incide sobre a superfície da terra é dividida em radiações ultravioletas (100-400 nm) que são percebidas através de reações fotoquímicas, radiações visíveis (400-800 nm), as quais são detectadas por meio das cores pelo sistema óptico, e radiações infravermelhas (acima 800 nm) que são percebidas através do calor (FLOR; DAVOLOS; CORREA, 2007). A radiação ultravioleta (UV) é a

que apresenta maior importância na perspectiva da saúde e é classificada em UVC (100-280 nm), UVB (280-320 nm) e UVA (320-400 nm) (RASCÓN; FERREIRA; SILVA, 2017).

A radiação UVC é lesiva aos seres vivos por apresentar elevada energia, entretanto não atinge a superfície da Terra, pois é absorvida pela camada de ozônio (WIDEL et al., 2014). Por outro lado, a radiação solar que alcança a superfície terrestre (UVB e UVA) pode interagir com a pele, por meio de mecanismos de absorção, reflexão e espalhamento, os quais são determinados pelas características da pele e do tipo de radiação (YOUNG; CLAVEAU; ROSSI, 2017).

A radiação UVB pode penetrar na pele humana em cerca de 160-180 μm de profundidade, alcançando assim a epiderme e podendo causar queimaduras solares, bronzeamento e fotocarcinogênese. Essa radiação é a principal causa de dano ao DNA, induzindo a inflamação e imunossupressão. Apenas uma pequena fração (cerca de 5% da radiação solar total) dessa faixa de radiação chega à superfície da terra, porém a redução da camada de ozônio tem levado ao aumento da incidência da radiação UVB sobre a superfície terrestre (NICHOLS; KATIYAR, 2010; RASCÓN; FERREIRA; SILVA, 2017).

A radiação UVA é a que apresenta maior poder de penetração, alcançando cerca de 1000 μm de profundidade, atingindo tanto a epiderme como a derme. A exposição excessiva a essa radiação induz a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) que causam danos a macromoléculas celulares, como as proteínas, lipídios e DNA. Apresenta maior papel no fotoenvelhecimento e carcinogênese por serem processos mediados por EROs, pela maior quantidade de luz solar irradiada (90 - 95% da radiação solar total que incide sobre a superfície do planeta) e ao fato de atingir as duas camadas da pele (FLOR; DAVOLOS; CORREA, 2007; NICHOLS; KATIYAR, 2010).

Assim, a exposição excessiva a radiação solar causa diversas desordens cutâneas e como consequência ocorre a formação de radicais livres, que em quantidade elevada resulta em estresse oxidativo e subsequente dano celular (ALBRECHT et al., 2019).

2.2 RADICAIS LIVRES E ESTRESSE OXIDATIVO

Radicais livres são espécies químicas que possuem um número ímpar de elétrons. No contexto do estresse oxidativo, os radicais são moléculas ou íons pequenos com baixas energias de ativação e curtos tempos de meia-vida que podem atravessar as membranas celulares,

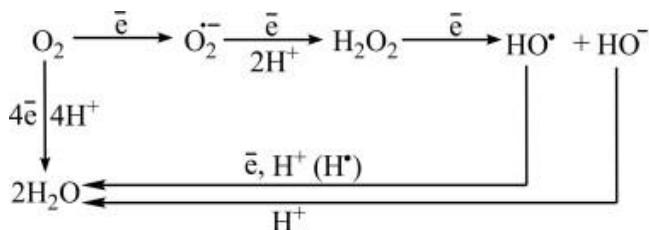
podendo ser considerados um subconjunto de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio (JENSEN, 2003).

A pele é um órgão muito complexo, exposta à agentes químicos, físicos e microbiológicos, os quais podem induzir a formação de EROs e ERNs. Essas espécies apresentam papel ambíguo no organismo, sendo fundamentais em processos fisiopatológicos e bioquímicos, quando existe um equilíbrio entre espécies reativas e antioxidantes, porém, alterações nesse estado podem levar ao estresse oxidativo (GUARATINI; MEDEIROS; COLEPICOLO, 2007; JENSEN, 2003; ŻUKOWSKI; MACIEJCZYK; WASZKIEL, 2018)

Dentre as EROs formadas na pele, destacam-se os radicais hidroxila ($\text{HO}\cdot$), superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), peroxila (RO_2^{\cdot}), alcoxila ($\text{RO}\cdot$), oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e peróxidos orgânicos (ROOH). Além das EROs, também estão envolvidas em processos redox as espécies reativas de nitrogênio (ERN), tais como $\cdot\text{NO}$, e espécies reativas de enxofre, com importância biológica significativa (GUARATINI; MEDEIROS; COLEPICOLO, 2007).

Para as reações de redução completa do O_2 é necessária a transferência de quatro elétrons (Figura 2), que ocorre em complexos enzimáticos na membrana mitocondrial resultando na formação de H_2O , entretanto pode ocorrer transferência univalente de elétrons que envolve ou não a formação de radicalares pela redução incompleta do O_2 na mitocôndria durante o transporte dos elétrons (GUARATINI; MEDEIROS; COLEPICOLO, 2007).

Figura 2 - Redução do oxigênio via transferência de um e quatro elétrons.



Fonte: LUSHCHAK (2014).

Menos de 10% do oxigênio consumido é reduzido via rotas sucessivas envolvendo um elétron, resultando na conversão do oxigênio molecular em radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), seguido da redução via um elétron com concomitante aceite de dois prótons para formar o peróxido

de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio formado nesta reação (H_2O_2) não é um radical livre, mas é quimicamente mais ativo que o oxigênio, razão pela qual está inserido no grupo das EROs. O peróxido de hidrogênio aceitando um ou mais elétrons é dividido em radical hidroxila ($HO\cdot$) e ânion hidroxil (OH^-). Finalmente, o ânion hidroxila interage com um ou mais elétrons e prótons, resultando na formação da molécula da água. Em sistemas biológicos, esta reação é principalmente realizada por meio da abstração de átomos de hidrogênio de diferentes compostos, tais como as proteínas e lipídios, resultando frequentemente na iniciação de processos em cadeia (LUSHCHAK, 2014). Assim, O_2^- , H_2O_2 e $HO\cdot$ são coletivamente chamados de EROs, mas unicamente O_2^- e $HO\cdot$ são radicais livres (GUARATINI; MEDEIROS; COLEPICOLO, 2007).

2.3 O BALANÇO REDOX DA PELE E O USO DE ANTIOXIDANTES

Antioxidantes são substâncias que reduzem ou inibem a formação de radicais livres ou EROs, podendo atuar por diferentes mecanismos, são usualmente classificados como endógenos ou exógenos, e atuam sinergicamente para neutralizar o estresse oxidativo (ADDOR, 2017; CAROCHO; MORALES; FERREIRA, 2018). Essas moléculas apresentam papel fundamental na prevenção e limitação dos danos causados pelas EROs (XIA et al., 2014).

O sistema antioxidante cutâneo é formado por substâncias enzimáticas e não-enzimáticas. Dentre os antioxidantes enzimáticos, destacam-se a glutathione peroxidase (GPx), a catalase (CAT) e a superóxido dismutase (SOD). A SOD, que contribui para um dos mecanismos antioxidantes mais eficientes, converte $O_2^{\bullet-}$ em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), prevenindo os danos que poderiam ser causados por este radical. A CAT e a GPx, por sua vez, são as principais responsáveis pela remoção imediata de H_2O_2 . A CAT, encontrada em peroxissomos, catalisa a decomposição específica de H_2O_2 gerando moléculas de água e oxigênio. A GPx é fundamental no metabolismo de H_2O_2 e de outros peróxidos, pois catalisa reações de doação de elétrons, no qual se utiliza da glutathione reduzida (GSH) como agente redutor, formando a glutathione oxidada (GSSG) (GUARATINI; MEDEIROS; COLEPICOLO, 2007; MIROŃCZUK-CHODAKOWSKA; WITKOWSKA; ZUJKO, 2018).

Os antioxidantes não-enzimáticos endógenos e exógenos, exercem um importante papel na manutenção do balanço redox celular. Nesta classe inclui-se um vasto número de compostos, sintetizados *in vivo* que previnem os danos oxidativos por interações diretas ou indiretas com as espécies reativas, e incluem compostos como a vitamina C e E,

carotenoides, hormônios (estradiol e estrógeno), melatonina e ácido lipóico (GUARATINI; MEDEIROS; COLEPICOLO, 2007; SINGH; KESHARWANI; KESERVANI, 2017). Antioxidantes exógenos estão presentes na dieta humana e apresentam uma grande diversidade de propriedades biológicas e estruturas químicas, sendo encontrados principalmente em frutas, verduras, nozes, cereais, chocolate, sucos, chás, vinho e café (GOTHAI et al., 2018; MIRONCZUK-CHODAKOWSKA; WITKOWSKA; ZUJKO, 2018).

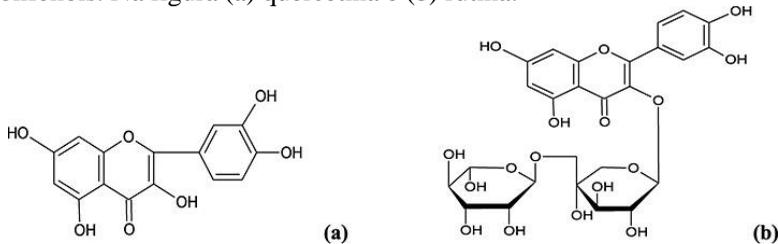
A aplicação tópica de antioxidantes enzimáticos ou não enzimáticos representa uma importante estratégia de proteção cutânea contra o estresse oxidativo ocasionado por diferentes agentes. Além da reposição utilizando moléculas endógenas, novas substâncias com ação antioxidante têm sido estudadas para combater o estresse oxidativo que causa o envelhecimento cutâneo, dentre as quais se destacam os polifenóis encontrados no bagaço de uva (GALANAKIS, 2017; GUARATINI; MEDEIROS; COLEPICOLO, 2007).

2.3.1 Polifenóis

O uso de antioxidantes naturais apresenta vantagens em relação aos sintéticos no que diz respeito à questão ambiental, de saúde e funcionalidade. Estes compostos atuam inibindo a formação de radicais livres ou interrompendo sua propagação pela captura de radicais que iniciam a peroxidação, quelando íons metálicos, quebrando a reação auto-oxidativa ou reduzindo concentração de O_2 (BREWER, 2011; GALANAKIS, 2017).

Os polifenóis caracterizam o maior grupo de antioxidantes naturais. São metabólitos secundários de plantas e estão sendo estudados para o tratamento de diversas patologias e condições crônicas, bem como na prevenção do envelhecimento cutâneo e dos efeitos deletérios causados a curto e longo prazo pela exposição à radiação UV (GOTHAI et al., 2018; OYENIHI; SMITH, 2019). Quimicamente os compostos fenólicos são caracterizados por possuírem pelo menos um anel aromático contendo um ou mais grupos hidroxila, que podem estar metilados, sulfonados ou glicosilados por açúcares, sendo subdivididos em fenóis simples ou polifenóis de acordo com a quantidade de unidades fenol da molécula (SAKAKI et al., 2019). Predominantemente os polifenóis encontram-se na forma glicosilada (Figura 3) nas plantas, apresentando melhor solubilidade em água que a forma aglicona, entretanto apresentam baixa biodisponibilidade dérmica, devido ao alto peso molecular e menor lipofilia (RATZ-LYKO et al., 2015; SAKAKI et al., 2019).

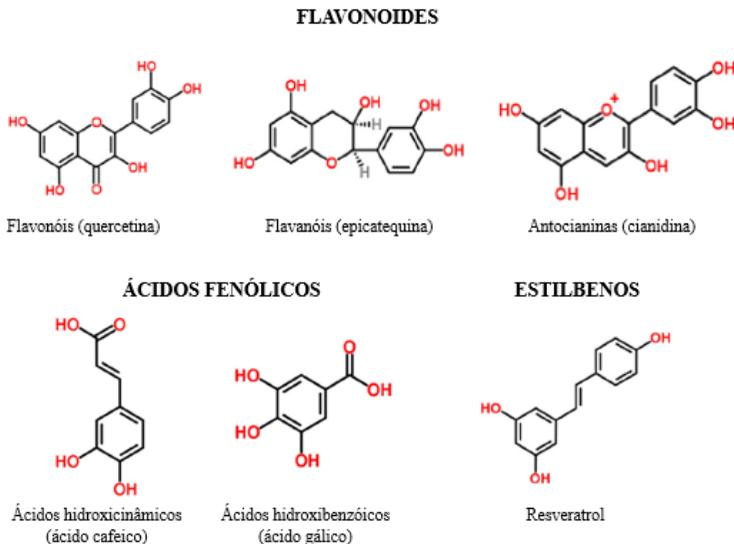
Figura 3 – Exemplos das formas aglicona (a) e glicosilada (b) de polifenóis. Na figura (a) quercetina e (b) rutina.



Fonte: adaptado de (RATZ-LYKO et al., 2015).

Os compostos fenólicos são divididos em dois grandes grupos: os flavonoides e os não flavonoides. Dentre o grupo dos não flavonoides estão incluindo os ácidos fenólicos, estilbenos e ligninas, enquanto que o grupo dos flavonoides é caracterizado por todos aqueles compostos que possuem uma estrutura básica C6-C3-C6, incluindo os flavonóis, flavanóis e a antocianinas (Figura 4) (PERRON; BRUMAGHIM, 2009; SAKAKI et al., 2019).

Figura 4 - Exemplos dos principais grupos de compostos fenólicos.



Fonte: adaptado de SAKAKI et al. (2019)

Com relação a atividade antioxidante, os polifenóis podem neutralizar ou suprimir a geração de radicais livres doando elétrons ou hidrogênio, diminuindo a taxa de oxidação, inibindo a formação de EROs e precursores de radicais livres, além de atuarem como eliminadores diretos das reações em cadeia da peroxidação lipídica. Ao doar um elétron para os radicais livres, estes são neutralizados e se transformam em radicais estáveis e menos reativos, rompendo a reação em cadeia induzida nos componentes celulares (SINGH; KESHARWANI; KESERVANI, 2017; TSAO, 2010).

2.3.2 Métodos para determinação da capacidade antioxidante *in vitro*

Apesar da grande variedade de métodos existentes para investigar a capacidade antioxidante *in vitro* de extratos vegetais e compostos puros, não há consenso sobre qual o melhor método para indicar a capacidade antioxidante total, em decorrência das limitações que cada um proporciona (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013; KARADAG; OZCELIK; SANER, 2009).

Baseados nas reações químicas envolvidas, os ensaios são destinados a medir a capacidade de eliminar os radicais livres ou compostos oxidantes. Estas reações são divididas em dois grupos: (I) reações de transferência de átomos de hidrogênio (TAH), os quais monitoram a cinética da reação competitiva e a quantificação derivada das curvas cinéticas, (II) reações de transferência de elétrons simples (TE), que envolvem uma reação redox com o oxidante, como indicador do ponto final da reação (GUPTA, 2015).

Os métodos baseados em transferência de átomos de hidrogênio medem a capacidade de um antioxidante em eliminar os radicais livres pela doação de um hidrogênio, sendo estes compostos por um gerador de radicais livres sintéticos, uma sonda molecular oxidável e um antioxidante. São exemplos de métodos TAH a capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC), o potencial antioxidante de captura radical total (TRAP) e o ensaio de branqueamento com β caroteno (CHANDA; DAVE, 2009; GUPTA, 2015).

Nos métodos de transferência de elétrons, a ação antioxidante é simulada com uma sonda fluorescente ou colorida (agente oxidante), onde os ensaios espectrofotométricos medem a capacidade de um antioxidante reduzir um oxidante, visualizado pela mudança de cor. O grau dessa alteração de cor, ou seja, o aumento ou diminuição da absorbância em um dado comprimento de onda está correlacionado com a concentração de

antioxidantes na amostra. São métodos TE a capacidade antioxidante equivalente ao trolox (TEAC/ABTS), potencial redutor de ferro (FRAP), redução do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), redução de radicais hidroxila, redução de radicais livres de óxido nítrico, ensaio de fenóis totais, ensaio da inibição da peroxidação lipídica e ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013; CHANDA; DAVE, 2009; GUPTA, 2015; PISOSCHI; NEGULESCU, 2012).

2.4 BAGAÇO DE UVA

No contexto dos antioxidantes de origem vegetal, os resíduos agroindustriais têm ganhado cada vez mais destaque na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica (OLIVEIRA et al., 2009). A preocupação ambiental com o processamento desses subprodutos e a nova oportunidade de mercado tem incentivado pesquisas para extração de compostos bioativos com aplicação em diferentes áreas (BANDARA; CHALAMAIAH, 2019; MELO et al., 2011).

A uva (*Vitis vinifera* L.) é uma das frutas mais cultivadas e consumidas no mundo e representa uma fonte em potencial de polifenóis (FRAIGE; PEREIRA-FILHO; CARRILHO, 2014; GALANAKIS, 2017). Essa fruta é amplamente consumida “*in natura*” ou utilizada como matéria-prima na produção de sucos, vinhos, geleias, uvas passas, entre outros produtos alimentícios (PINTACÁ et al., 2018). No Brasil a uva apresenta grande importância econômica e a maior parte do cultivo é destinado à produção de vinhos de mesa e suco de uva (MELLO, 2017). Apesar da viticultura estar presente em diversos estados do país, a Região Sul (principalmente Rio Grande do Sul e Santa Catarina) é responsável por mais de 50% da produção nacional de uvas e pela maior parte do processamento industrial, visando principalmente a elaboração de vinhos (LAZAROTTO; TAFFAREL; MONTEIRO, 2016).

Na produção de vinhos e sucos de uva existem diversos pontos críticos que podem desencadear problemas ambientais, dessa forma o gerenciamento adequado dos resíduos orgânicos produzidos e a reutilização dos subprodutos para fins alternativos é de grande importância para reduzir o impacto negativo, podendo ainda resultar em produtos de valor agregado (BERES et al., 2017; CALDAS et al., 2018). Na vitivinicultura um dos principais resíduos sólidos gerados é o bagaço (Figura 5) que consiste basicamente de uma mistura de casca e sementes, muito utilizado como fertilizantes ou alimentação animal (GALANAKIS, 2017; OLIVEIRA et al., 2009). A quantidade de resíduos depende da

variedade da uva, processo de prensagem e da fermentação, porém, de modo geral o bagaço corresponde a cerca de 20% do peso original da uva, sendo que após o processamento em torno de 70% do conteúdo fenólico é preservado no bagaço (BERES et al., 2017; SOTO; FALQUÉ; DOMÍNGUEZ, 2015).

Apesar do escasso reaproveitamento dos resíduos, diversos estudos têm relatado a utilização do bagaço de uva como potencial alternativa para a produção de extratos com fins antioxidantes (AMENDOLA; DE FAVERI; SPIGNO, 2010; BABBAR et al., 2011; LAVELLI et al., 2016; PEDROZA et al., 2015; SPIGNO; DE FAVERI, 2007).

Figura 5 - Bagaço de uva (*Vitis vinífera* L.).



Fonte: o autor.

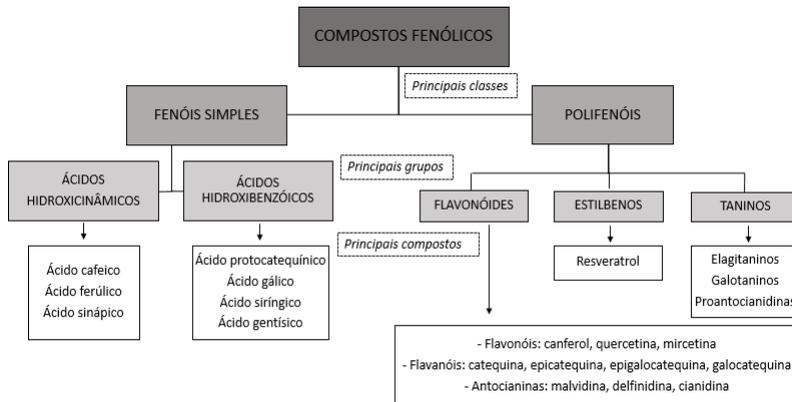
2.4.1 Composição química

Por ser um subproduto de origem vegetal, o bagaço é considerado uma matriz complexa com grande variabilidade de compostos (Figura 6). Os compostos fenólicos encontrados no bagaço das uvas podem ser classificados em flavonoides e não flavonoides. Dentre a classe dos flavonoides são relatados compostos pertencentes às subclasses dos flavanois (catequina, epicatequina e epigalocatequina), flavonóis (kaempferol, quercetina e miricetina) e antocianinas (malvidina, delphinidina, cianidina) (BERES et al., 2017).

Os compostos que não pertencem ao grupo dos flavonoides incluem os ácidos fenólicos, hidroxibenzoicos e hidroxicinâmicos, e o resveratrol, polifenol pertencente à classe dos estilbenos. Compostos

polifenólicos encontrados nas uvas também incluem os taninos hidrolisáveis (elagitaninos, galotaninos) e as proantocianidinas (ABE et al., 2007; BERES et al., 2017; GALANAKIS, 2017; HU et al., 2017).

Figura 6 - Principais compostos fenólicos encontrados no bagaço de uva.



Fonte: Adaptado de Beres e colaboradores (2017).

2.4.2 Propriedades biológicas

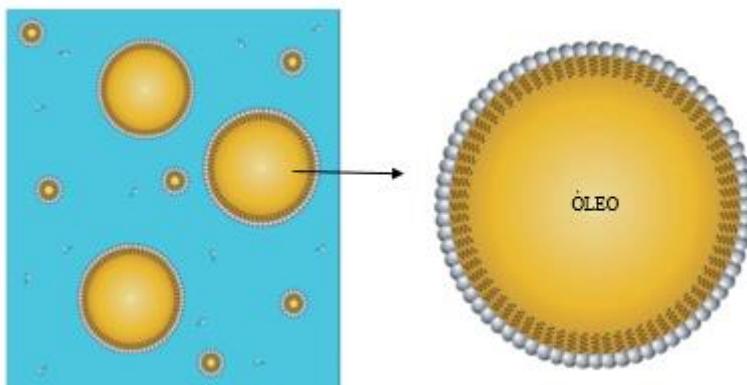
O interesse no bagaço de uva como fonte de recuperação de compostos bioativos se deve ao fato deste subproduto apresentar uma porção significativa de polifenóis, uma vez que a maceração durante o processo de fabricação de sucos e vinhos é incompleta (NAYAK et al., 2018). Estudos têm enfatizado o interesse da utilização dos polifenóis da uva devido as atividades biológicas destes compostos, dentre elas: antimicrobiana (GOUVINHAS et al., 2018), antioxidante (ANTONIOLLI et al., 2015; CAMPOS et al., 2008; KHARADZE et al., 2018; SPIGNO; DE FAVERI, 2007), cardioprotetora (LEIFERT; ABEYWARDENA, 2008; NUNES et al., 2016), anti-inflamatória (DENNY et al., 2014; FERRI et al., 2017), antienvhecimento (ABURJAI; NATSHEH, 2003; SOTO; FALQUÉ; DOMÍNGUEZ, 2015), anticâncer (AGARWAL; SINGH; AGARWAL, 2002; BADR EL-DIN; ALI; ABOU-EL-MAGD, 2019; ZHOU; RAFFOUL, 2012), entre outras. Além disso, os compostos recuperados do bagaço de uva estão envolvidos na proteção cutânea frente à processos foto-oxidativos desencadeados pela exposição à radiação UV e tem despertado interessa na área de

alimentos, medicamentos e cosméticos (GALANAKIS, 2017; NICHOLS; KATIYAR, 2010; SOTO; FALQUÉ; DOMÍNGUEZ, 2015).

2.5 NANOEMULSÕES

As nanoemulsões são sistemas heterogêneos translúcidos, constituídas por dois líquidos imiscíveis, em que um encontra-se distribuído na forma de pequenas gotículas estabilizadas por um sistema surfactante em uma fase dispersante ou externa (MCCLEMENTS; RAO, 2011; ROBERTS et al., 2017). Os componentes imiscíveis mais utilizados são o óleo e a água, sendo as nanoemulsões óleo em água (O/A) as mais comuns (Figura 7) (MCCLEMENTS, 2018; SINGH et al, 2017).

Figura 7 - Esquema de nanoemulsão do tipo óleo em água (o/a).



Fonte: Adaptado de MCCLEMENTS (2012)

Esses sistemas apresentam tamanho de gota entre 20 e 400 nm, com uma ou mais populações homogêneas e aparência clara ou ligeiramente turva (RAI et al., 2018). O tamanho reduzido das nanoemulsões têm influência direta na estabilidade física a longo prazo, reduzindo os fenômenos de desestabilização presentes nas emulsões convencionais, como a cremagem, coalescência e sedimentação (SINGH et al., 2017). Além disso, o movimento browniano domina as forças gravitacionais, conferindo maior estabilidade contra a separação gravitacional, e agregação de partículas (BOURBON et al., 2018).

As nanoemulsões apresentam como vantagens a capacidade de aumentar a solubilidade, velocidade de dissolução e biodisponibilidade de fármacos devido ao seu tamanho nanométrico. Além disso, permitem

a liberação prolongada e a possibilidade de utilização por diferentes vias de administração (PATHAK; PATTNAIK; SWAIN, 2018; SHAH; BHALODIA; SHELAT, 2010).

2.5.1 Preparo e caracterização das nanoemulsões O/A

As nanoemulsões podem ser obtidas por métodos de emulsificação de alta e baixa energia. Os métodos de alta energia utilizam energia intensa para fragmentar a fase oleosa em uma fase aquosa, utilizando dispositivos mecânicos, como o homogeneizador à alta pressão, ultrassônico ou microfluidizador (MCCLEMENTS; JAFARI, 2018). Os métodos de baixa energia são baseados na formação espontânea de gotículas de óleo em uma mistura de surfactante/água de acordo com a composição ou temperatura, utilizando assim as propriedades físico-químicas do sistema no processo de emulsificação. Os métodos de baixa energia incluem a inversão de fases e a emulsificação espontânea, e apresentam vantagens, como a redução de custos com equipamentos, facilidade de implementação e operação, no entanto, utilizam maior quantidade de surfactantes e/ou solventes orgânicos na preparação (DAVIDOV-PARDO; MCCLEMENTS, 2015; LOVELYN; ATTAMA, 2011).

As formulações obtidas por emulsificação ultrassônica são controladas por três parâmetros principais: o tempo, frequência e potência. As ondas de pressão geradas pelos transdutores ultrassônicos formam microbolhas perto da ponta da sonda que oscilam bruscamente e implodem, gerando forças de cisalhamento intensas, levando a geração de pequenas gotículas durante a homogeneização (GHARIBZAHEDI; JAFARI, 2018). Já a emulsificação espontânea é baseada na adição de uma solução do óleo contendo o fármaco e um solvente miscível em água, em uma fase aquosa contendo um surfactante. A rápida difusão do solvente orgânico na fase aquosa gera uma turbulência interfacial, chamada de efeito Marangoni, que leva a redução da tensão interfacial e a formação instantânea de uma emulsão com tamanho de gota nanométrico (BOUCHEMAL et al., 2004; DAVIDOV-PARDO; MCCLEMENTS, 2015; SAJJADI; JAHANZAD; BROOKS, 2002).

As nanoemulsões o/a contém cerca de 5 a 20% de óleo, os quais são normalmente selecionados em função da solubilidade do fármaco, podendo estes serem empregados de forma isolada ou combinados para formação das gotículas. São estabilizadas por surfactantes e co-surfactantes, que reduzem a tensão na interface óleo-água, impedindo a coalescência das gotas. Mecanismos como interações de Van der Waals,

ligações covalentes, interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio estão envolvidos na adsorção do surfactante na interface óleo-água (KUMAR; MANDAL, 2018; SINGH et al., 2017).

A otimização das formulações nanométricas é baseada principalmente no tamanho das partículas, índice de polidispersão e potencial zeta, além das características visuais (RAI et al., 2018). As nanoemulsões apresentam diferentes tamanhos de gotícula, sendo usualmente caracterizados pela técnica de espalhamento de luz dinâmico,, também conhecida como espectroscopia de correlação fotônica (MCCLEMENTS; JAFARI, 2018; SZE et al., 2003). Nesse método a amostra é irradiada por um feixe de luz e as flutuações de intensidade-tempo do feixe de luz transmitido ou refletido são mensuradas em um ângulo fixo (BOURBON et al., 2018). Os resultados de tamanho são apresentados usualmente como média e índice de polidispersão (PDI), que caracterizam a distribuição granulométrica e a homogeneidade da formulação, sendo um $PDI < 0,2$ indicativo de homogeneidade e valores próximos a 1 indicam a heterogeneidade de partículas (KLANG; VALENTA, 2011).

O potencial zeta é outra característica avaliada nas nanoemulsões e apresenta um importante indicativo de estabilidade física e química do sistema (BOURBON et al., 2018). O potencial zeta de uma dispersão é mensurado pela técnica de anemometria laser doppler. A dispersão coloidal é submetida a um campo elétrico e as partículas migram para o eletrodo de carga oposta com a velocidade proporcional a magnitude da densidade de cargas na superfície das partículas. Esta velocidade, expressa pela mobilidade eletroforética das partículas é usada para o cálculo do potencial zeta (HONARY; ZAHIR, 2013). Outras características das nanoemulsões que podem ser avaliadas incluem a morfologia, pH, teor, eficiência de encapsulação e perfil de liberação do fármaco (BOURBON et al., 2018; LOVELYN; ATTAMA, 2011).

2.6 ADMINISTRAÇÃO E LIBERAÇÃO TÓPICA CUTÂNEA DE FÁRMACOS

A via oral é a via mais comumente utilizada para a administração de medicamentos, entretanto apresenta significativas limitações como a degradação do fármaco no trato gastrointestinal por enzimas e pH, metabolismo de primeira passagem e efeitos colaterais (CZAJKOWSKA-KOŚNIK; SZEKALSKA; WINNICKA, 2019). Dessa forma, o uso de medicamentos tópicos é interessante para contornar os problemas

relacionados a administração oral, além de ser uma via indolor (YOTSUMOTO et al., 2018).

O desenvolvimento de formulações tópicas deve levar em consideração as propriedades físico-químicas do fármaco, como solubilidade e pK_a , deve ser um medicamento estável em que os excipientes e fármacos sejam compatíveis e o fármaco deve ser liberado após aplicação. Além disso é importante que tenha boas características sensoriais como textura e fragrância (AULTON; TAYLOR, 2013).

A pele humana é formada por várias camadas complexas, responsável naturalmente pela proteção contra a entrada de moléculas e proteínas enquanto regula a temperatura corporal e a perda de água (ROBERTS et al., 2017). Assim, constitui uma potente barreira para a liberação de fármacos e um desafio nas formulações tópicas cutâneas (AULTON; TAYLOR, 2013). Dentre as camadas da pele, a que representa a maior barreira na penetração de substância é o estrato córneo, estruturalmente formado por corneócitos envoltos em uma camada lipídica complexa (VOGT et al., 2016). Os compostos ativos podem atravessar o estrato córneo pela via intracelular (ou transcelular), através dos corneócitos; intercelular, através dos espaços entre os corneócitos; transfolicular, através dos folículos pilosos; ou, ainda, pelas glândulas sudoríparas (SOARES et al., 2015). Apenas algumas substâncias conseguem ultrapassar a camada córnea, tendo como requisitos o baixo peso molecular (500 Da), coeficiente de partição adequado (Log P entre 1-3), e relativa solubilidade aquosa para serem capazes de atravessar domínios aquosos (ROBERTS et al., 2017). Dessa forma, o grande desafio no desenvolvimento de uma formulação de uso tópico reside em superar o efeito barreira da camada córnea, com o intuito de entregar o composto ativo no local desejado, em quantidades suficientes para exercer o efeito terapêutico e com o mínimo de efeitos adversos (ROBERTS et al., 2017).

2.6.1 Aplicação tópica cutânea de nanoemulsões

Muitas estratégias têm sido propostas com intuito de aumentar a penetração de compostos ativos através da pele. Dentre elas destaca-se o emprego de sistemas nanoestruturados, tais como as nanoemulsões que permitem proteger os ingredientes ativos frente à degradação, controlar a liberação e reduzir a irritação cutânea (GOYAL et al., 2016; JEPPS et al., 2013; ROBERTS et al., 2017; SOTO; FALQUÉ; DOMÍNGUEZ, 2015). Esses sistemas apresentam grande aplicação tanto na indústria farmacêutica quanto cosmética, com indicações como anti-inflamatória,

antienvelhecimento, hidratação e beleza. Apresentam importância particular no tratamento de doenças crônicas de pele como dermatite atópica ou pele seca, fornecendo proteção e hidratação à pele, sem irritação ou enfraquecimento da barreira da pele (ROBERTS et al., 2017).

As nanoemulsões podem melhorar a penetração de ativos na pele por vários mecanismos: aumento da capacidade de solubilização de compostos lipofílicos e hidrofílicos, incorporação e dose de aplicação na formulação, aumento da área superficial e contato com a pele, e melhoramento da permeação pela semelhança dos componentes da formulação com a estrutura lipídica do estrato córneo (ROBERTS et al., 2017). Após aplicação, a água da formulação evapora conduzindo à formação de uma matriz lipídica mais ordenada e de uma solução saturada do fármaco sobre a pele, aumentando a absorção. Além disso, o filme lipídico produz um efeito oclusivo, hidratando a pele e favorecendo a absorção cutânea (ALVES et al., 2007).

Diversos estudos relatam a aplicação de fármacos nanoemulsionados através da pele, incluindo ibuprofeno (SALIM et al., 2018), clotrimazol (SORIANO-RUIZ et al., 2019), fenitoína (TEO et al., 2017), anfotericina B (SOSA et al., 2017), isotretinoína (MIASTKOWSKA et al., 2016) e clobetasol (ALAM et al., 2013). Também são relatadas pesquisas com nanoemulsões obtidas a partir de compostos de origem vegetal (AJAZUDDIN; SARAF, 2010; BACCARIN et al., 2015; LEE et al., 2019; MENG et al., 2019; RABELO et al., 2018; ROSTAMI et al., 2018; SESSA et al., 2013; TAARJI et al., 2018).

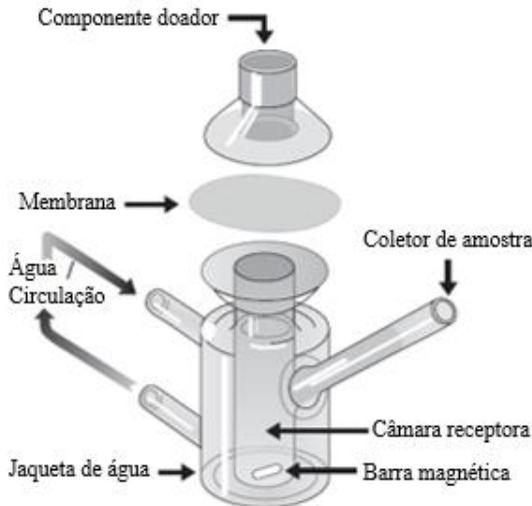
2.6.2 Estudos de permeação e retenção cutânea *in vitro*

Estudos de permeação e retenção cutânea *in vitro* apresentam um importante papel na otimização de formulações, proporcionando informações relevantes sobre o perfil de permeação de sistemas de liberação de fármacos, rota de permeação, mecanismo de ação do sistema carreador e quantificação do fármaco nas camadas da pele (DEPIERI et al., 2015; LEVEQUE et al., 2004; LUCERO et al., 2013).

Os ensaios em células de difusão de Franz são a ferramenta mais utilizada para avaliação da permeação/retenção de fármacos livres ou a partir de formulações (ALVES et al., 2016). É uma técnica relativamente simples, onde emprega-se uma célula de difusão de dois compartimentos (doador e receptor), separados por uma membrana ou pele (Figura 8) (DEPIERI et al., 2015). Alguns cuidados devem ser considerados para o estudo, como a seleção da membrana apropriada para o experimento, a

escolha da solução receptora, temperatura utilizada, quantidade de formulação, veículo de aplicação do fármaco, replicata de experimentos, filtração da amostra quando necessária, entre outros fatores (AULTON; TAYLOR, 2013).

Figura 8 - Representação esquemática da célula de difusão de Franz.

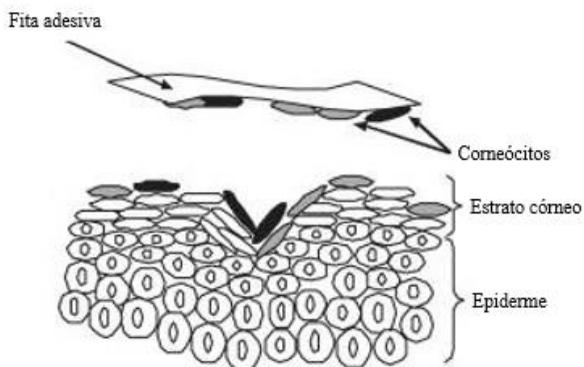


Fonte: Adaptado de FINNIN; WALTERS; FRANZ (2012).

Nos experimentos com pele, a formulação é colocada no compartimento doador e permanece em contato direto com o estrato córneo. Um fluido receptor é mantido sob constante agitação e aquecimento no compartimento receptor, sendo uma solução onde a substância em teste é solúvel a fim de garantir a condição *sink*. São realizadas coletas em tempos pré-estabelecidos para quantificação da substância de interesse (DEPIERI et al., 2015). Além da quantificação do meio coletado, o *tape stripping* pode ser utilizado como técnica complementar de quantificação do ativo presente no estrato córneo, que consiste basicamente da retirada do estrato córneo por aplicação de fitas adesivas na pele (Figura 9) (ESCOBAR-CHÁVEZ et al., 2008).

Outra determinação que pode ser realizada é da quantidade retida da substância na derme e epiderme, realizando-se a extração da substância dos tecidos com solvente apropriado, seguido da quantificação por método analítico validado (ESCOBAR-CHÁVEZ et al., 2008).

Figura 9 - Representação esquemática da separação do estrato córneo pela técnica de tape *stripping*.



Fonte: Adaptado de PAILLER-MATTEI et al. (2011)

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Matérias-primas

- Bagaço de uva da variedade *Cabernet Sauvignon* (Villa Francioni, São Joaquim/SC);
- Isoquercetina (Sigma-Aldrich, EUA);
- Lecitina de Soja (Lipoid S100[®], Lipoid GmbH, Alemanha);
- Óleo de rícino (Sigma-Aldrich, EUA);
- Óleo de semente de uva (Distriol, Brasil);
- Polissorbato 80 (Sigma-Aldrich, EUA);
- Resveratrol (Sigma-Aldrich, EUA);
- Triglicerídeos do ácido cáprico/caprílico (Pharmanostra, Brasil).

3.1.2 Solventes e Reagentes

- Acetato de etila P.A. (Panreac, Espanha);
- Acetato de sódio P.A. (Neon, Brasil);
- Acetona P.A (Neon commercial, Brasil);
- Acetonitrila grau HPLC (JT Baker, EUA);
- Ácido ascórbico (Via Farma, Brasil);
- Ácido clorídrico 37% P.A. (Biotec, Brasil);
- Ácido fórmico grau HPLC (Fisher Scientific GmbH, Alemanha);
- Ácido gálico (Sigma - Aldrich, EUA);
- Água ultrapura (Milli-Q[®], Millipore, EUA);
- Álcool etílico 95% P.A. (Neon, Brasil);
- Cloreto de potássio P.A. (Vetec, Brasil);
- Dimetil Sulfóxido – DMSO (Neon, Brasil)
- DPPH - 2,2 - difenil - 1 - picril - hidrazila (Sigma, Aldrich, USA);
- Fast Blue BB Salt hemi (zinc chloride) salt (Sigma - Aldrich, EUA);
- Fosfato de potássio dibásico (Alphatec, Brasil);
- Fosfato de sódio monobásico (Alphatec, Brasil);
- Hexano (Neon, Brasil);
- Hidróxido de sódio P.A. (Alphatec, Brasil);

3.1.3 Equipamentos

- Agitador magnético multistirrer 15 (Velp Scientifica, Itália);
- Agitador Vortex KMC-1300V (Vision Scientific, EUA);
- Balança analítica AUW220D (Shimadzu, Japão);
- Balança analítica BG200 (Gehaka, Brasil);
- Banho de ultrassônico USC 700 (Unique-Brasil);
- Célula de difusão de Franz (DIST, Brasil);
- Coluna Zorbax Eclipse Plus C18 (Agilent, Canadá);
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (Shimadzu, Japão) acoplado à espectrômetro de massas (Bruker, EUA);
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência, acoplado a detector de arranjo de diodos – LC-20AD (Shimadzu, Japão);
- Espectrofotômetro UV/Visível – 1800 (Shimadzu, Japão);
- Evaporador rotatório R-300 (Büchi, Suíça);
- Liofilizador LD1500 (Terroni, Brasil);
- LUMiSizer® (LUM GmbH, Alemanha);
- Medidor de pH mPA210 (MSTecnoPON Instrumentação, Brasil);
- Microscópio eletrônico de transmissão Jeol JEM-1011 (Tóquio, Japão);
- Minicentrífuga (Ministar, Itália);
- Ponta ultrassônica UP200S (Marconi, Brasil);
- Pré-coluna Zorbax Eclipse Plus C18 (Agilent, Canadá);
- Rotaevaporado R-300 (Buchi, Suíça);
- Zetasizer Nano ZS® (Malvern Instruments, Reino Unido);

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Obtenção, caracterização e processamento da matéria-prima

3.2.1.1 Obtenção do bagaço de uva

O bagaço de uva da variedade *Cabernet Sauvignon* (*Vitis vinífera*) foi disponibilizado pela Vinícola Villa Francioni localizada em São Joaquim/SC, correspondente a safra 2016/2017. O material foi coletado no mês de abril de 2017 antes da fermentação do mosto, ou seja, após a etapa de esmagamento e prensagem, e congelado para o transporte.

3.2.1.2 Teor de umidade do bagaço de uva

O material foi descongelado e submetido ao ensaio de perda por dessecação pelo método de secagem direta em estufa a 105 °C descrito pelo Instituto Adolfo Lutz (2008). Cerca de 10 gramas de bagaço foram pesados em cápsulas de porcelana previamente dessecadas por 30 minutos. As amostras foram colocadas em estufa a 105 °C durante 3 horas. Em seguida foram armazenadas em dessecador para resfriamento e pesadas. O teor de umidade foi calculado em porcentagem, conforme Equação 1:

$$U (\%) = \frac{100 \times N}{P} \quad \text{Equação 1}$$

Em que N é a massa de água em gramas e P é a massa da amostra em gramas. Os resultados foram expressos pela média de três determinações.

3.2.1.3 Secagem do bagaço de uva

A secagem do bagaço de uva foi realizada usando dois procedimentos. No primeiro, parte da matéria-prima foi sub submetida à inativação enzimática por meio de tratamento térmico à 80 °C durante 10 minutos, e em seguida levada em estufa a 50 °C por 48 horas (ROCKENBACH, 2008). Uma segunda parte do bagaço foi submetida à secagem por liofilização por 48 horas. O bagaço seco pelas duas técnicas foi triturado em liquidificador e armazenado em dessecador até sua utilização.

3.2.2 Preparo e caracterização das soluções extrativas a partir do bagaço de uva

3.2.2.1 Preparo das soluções extrativas

Foram preparadas três diferentes soluções extrativas (SE), a partir do bagaço de uva sem secagem (BSS), considerando o teor de umidade inicial da matéria-prima para adição do líquido extrator, do bagaço seco em estufa (BSE) e do bagaço liofilizado (BL). As soluções extrativas foram preparadas conforme descrito por Rockenbach (2008) com modificações, utilizando etanol: água (70:30, v/v) acidificado com ácido clorídrico 0,1% como líquido extrator e a proporção planta: solvente (1:5 m/v). A extração foi procedida por maceração durante 48 horas e ao abrigo da luz. Após, as misturas foram filtradas a vácuo e as soluções extrativas resultantes foram acondicionadas em frascos âmbar e armazenadas em geladeira.

3.2.2.2 Caracterização das soluções extrativas

3.2.2.2.1 Determinação do teor de resíduo seco

O teor de resíduo seco das soluções extrativas foi determinado segundo a metodologia descrita na Farmacopéia Brasileira (2010) para extratos fluidos e moles. Para isso, 2 gramas de cada uma das soluções extrativas foram transferidos para pesa-filtros previamente tarados. As amostras foram colocadas em banho-maria e deixadas evaporar até secura. Em seguida, foram colocadas em estufa a 100 - 105 °C por 3 horas. Os pesa-filtros foram colocados em dessecador até resfriamento e então pesados. O resíduo seco foi calculado em porcentagem sobre a massa inicial de SE, conforme Equação 2:

$$RS (\%) = \frac{m_f}{m_i} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

em que, m_f é a massa da solução extrativa em gramas após secagem em estufa por 3 horas e m_i é a massa inicial em gramas da solução extrativa. O resultado foi expresso pela média \pm desvio padrão de três determinações.

3.2.2.2.2 Determinação do teor de compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado por método espectrofotométrico, utilizando o sal de diazônio Fast Blue BB, conforme descrito por Medina (2011). Para a construção da curva de calibração, soluções de ácido gálico foram preparadas na faixa de concentração de 0,02 a 0,08 mg mL⁻¹. Uma alíquota de 2,0 mL de cada uma das soluções foi transferida para tubos de ensaio para os quais foram adicionados 0,2 mL do reagente Fast Blue BB 0,1% (m/V) e a mistura foi homogeneizada por 1 minuto. Em seguida, 0,2 mL de uma solução de hidróxido de sódio 5% (m/V) foi adicionado às soluções. Estas foram deixadas reagir por 90 minutos em temperatura ambiente e, em seguida, as absorbâncias foram lidas a 420 nm em espectrofotômetro. A média das absorbâncias referentes a cada concentração foi utilizada para a construção da curva de calibração, a equação da reta e o coeficiente de correlação foram determinados pela análise da regressão linear, utilizando o método dos mínimos quadrados.

Para as análises, as soluções extrativas (SE) foram diluídas na proporção 1:50 (v/v) em etanol. Uma alíquota de 2,0 mL de cada uma das soluções resultantes foi transferida para tubos de ensaio e a análise foi realizada igualmente descrito acima para a curva padrão. O teor de compostos fenólicos totais foi estimado usando curva de calibração de ácido gálico. Todas as análises foram realizadas em triplicata, e os resultados expressos em mg equivalentes de ácido gálico por mililitro de solução extrativa.

3.2.2.2.3 Determinação do teor de antocianinas totais

O teor de antocianinas totais foi determinado pelo método do pH diferencial descrito por Giusti e Wrolstad (2001). Para as análises, uma alíquota de 0,05 mL de cada uma das soluções extrativas foi adicionada a tubos de ensaio e apropriadamente diluídas pela adição de 1,95 mL de tampão cloreto de potássio 0,025 M pH 1,0 ou acetato de sódio 0,4 M pH 4,5. As amostras foram homogeneizadas e após 15 minutos as absorbâncias foram lidas a 520 e 700 nm, utilizando água destilada como branco. O teor de antocianinas monoméricas totais (AMT) foi estimado utilizando as Equações 3 e 4, onde A é a absorbância calculada pela diferença das absorbâncias obtidas para as soluções em pH 1,0 e 4,5, nos dois comprimentos de onda, PM é o peso molecular da cianidina-3-glicosídeo (449,2 g/mol), FD é o fator de diluição das amostras, ϵ é a

absortividade molar da cianidina-3-glicosídeo ($26900 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) e L é o caminho óptico da cubeta (cm).

$$A = (A_{520} - A_{700})_{pH1} - (A_{520} - A_{700})_{pH4,5} \quad \text{Equação 3}$$

$$AMT (mg L^{-1}) = \frac{A \times PM \times FD \times 1000}{\varepsilon \times L} \quad \text{Equação 4}$$

Os resultados foram expressos em mg de cianidina-3-glicosídeo por mililitro de solução extrativa.

3.2.2.3 Avaliação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante das soluções extrativas obtidas a partir do bagaço de uva foi avaliada pelo método de sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH \cdot), conforme descrito por Choi e colaboradores (2002), com modificações. Para as análises, as soluções extrativas foram diluídas em etanol nas faixas de concentração de 54,7-328,5 (SE-BSS), 57,0-128,3 (SE-BSE) e 57,0-142,6 (SE-BL) $\mu\text{g mL}^{-1}$, com base no resíduo seco. Uma alíquota de 2,5 mL de cada uma das soluções foi transferida para tubos de ensaio e 1,0 mL de uma solução de DPPH 0,3 mM em etanol foi adicionado. As amostras foram deixadas reagir durante 30 minutos ao abrigo de luz, e em seguida as absorbâncias das mesmas foram lidas a 518 nm, utilizando etanol para zerar o equipamento. Uma mistura de etanol: água (2,5:1,0 v/v) foi utilizada como branco, ácido gálico como controle positivo em concentrações de 0,1 a 3,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e uma de solução de DPPH preparada na ausência das amostras foi empregada como controle negativo. O percentual de redução do radical DPPH foi estimado usando a Equação 5, onde Abs corresponde às absorbâncias obtidas para a amostra, branco e controle negativo

$$\% \text{ redução DPPH} = 100 - \frac{Abs_{amostra} - Abs_{branco} \times 100}{Abs_{controle\ negativo}} \quad \text{Equação 5}$$

Gráficos de percentual de DPPH reduzido *versus* concentração das amostras $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram construídos e os valores de EC_{50} (concentração necessária para reduzir em 50% a quantidade inicial de DPPH \cdot) foram obtidos a partir da análise da regressão linear. As análises foram realizadas em triplicata.

3.2.3 Obtenção e caracterização da fração acetato de etila a partir da solução extrativa do bagaço de uva

3.2.3.1 Obtenção da fração acetato de etila

Uma alíquota de 500 mL da solução extrativa selecionada foi submetida à evaporação sob pressão reduzida para eliminação do solvente. O resíduo foi então ressuspensão em 250 mL de ácido acético 2% e submetido à extração com 250 mL de acetato de etila em funil de separação, por três vezes. As frações foram reunidas, evaporadas até secura sob pressão reduzida e liofilizadas, obtendo-se a fração acetato de etila (FAE) (BACCARIN; LEMOS-SENNA, 2014).

3.2.3.2 Caracterização da fração acetato de etila

3.2.3.2.1 Determinação do teor de compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado conforme descrito em 3.2.2.2.2 a partir de uma solução da fração acetato de etila na concentração 0,06 mg mL⁻¹ em etanol. O teor de compostos fenólicos totais foi estimado usando curva de calibração de ácido gálico e os resultados foram expressos em mg equivalentes de ácido gálico por 100 g da fração acetato de etila.

3.2.3.2.2 Determinação do teor de antocianinas totais

Para determinação do teor de antocianinas totais na FAE, uma solução etanólica a 1,0 mg mL⁻¹ foi preparada e procedeu-se a análise conforme descrito no item 3.2.2.2.3. Os resultados foram expressos em mg de cianidina-3-glicosídeo por 100 g da fração acetato de etila.

3.2.4 Desenvolvimento e validação da metodologia analítica de cromatografia líquida para identificação e quantificação dos compostos fenólicos na FAE e nas nanoemulsões

3.2.4.1 Identificação dos compostos fenólicos do bagaço de uva

3.2.4.1.1 Instrumentação e condições cromatográficas

A identificação dos compostos fenólicos foi realizada em um sistema de cromatografia líquida de alto desempenho (UFLC

Prominence, Shimadzu, Japão) (CEBIME, UFSC), equipado com uma bomba binária LC-20AD, auto-injetor SIL-20AC HT, forno de coluna CTO-20A, detector de arranjo de fotodiodos SPD-M20 (DAD) e espectrofotômetro de massa microTOF-Q II (MS/MS; Bruker Alemanha) em modo de ionização eletrospray negativo. As análises foram realizadas em modo de fase reversa, usando coluna Zorbax Eclipse Plus C18 (250 x 4,6 mm, 5,0 μm), acoplada a uma pré-coluna Zorbax Eclipse Plus C18 (12,5 x 4,6 mm, 5,0 μm) e mantida a temperatura de 40 °C. O sistema foi operado em modo gradiente de eluição, com fase móvel constituída de acetonitrila (canal A) e solução de ácido fórmico 0,1% (v/v) (canal B), conforme demonstrado na Tabela 1. A fase móvel foi eluída com fluxo de 1,0 mL min⁻¹. O volume de injeção foi de 20 μL e a detecção foi realizada inicialmente em comprimentos de onda na faixa de 220 a 550 nm, utilizando o software LCsolution para aquisição dos dados.

Tabela 1 - Condições utilizadas no gradiente de eluição do método cromatográfico.

Tempo (min)	Canal A (%)	Canal B (%)
0-5	2	98
5-7	10	90
7-60	25	75
60-61	80	20
61-64	80	20
64-65	2	98
65-76	2	98

3.2.4.1.1 Identificação dos compostos fenólicos

Para identificação dos compostos fenólicos na fração acetato de etila, uma solução estoque a 1,0 mg mL⁻¹ em acetonitrila foi preparada. Esta solução foi diluída na proporção 1:1 em uma solução água: acetonitrila (98:2), obtendo-se uma solução a 500,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As amostras foram filtradas em filtros de seringa PVDF 0,2 μm (Agilent, Canadá) e injetadas no sistema CLAE-DAD-ESI-MS/MS descrito acima. O software DataAnalysis foi utilizado para análise dos resultados, os bancos de dados online MetFrag, Pubchem e Massbank juntamente com a injeção de padrões dos compostos fenólicos disponíveis foram utilizados na tentativa de identificação.

3.2.4.2 Determinação dos compostos fenólicos isoquercitrina e resveratrol por CLAE-DAD na FAE e nas nanoemulsões

3.2.4.2.1 Instrumentação e condições cromatográficas

Para a determinação da isoquercitrina (ISO) e resveratrol (RES) na FAE e nas nanoemulsões, as análises foram realizadas em um sistema de cromatografia líquida de alto desempenho (UFLC Prominence, Shimadzu, Japão) (CENTRALCROM, UFSC), equipado com uma bomba LC-20AD, auto-injetor SIL-20AC HT, forno de coluna CTO-20A e detector de arranjo de fotodiodos SPD-M20 (DAD). As análises foram realizadas utilizando as condições cromatográficas descritas em 3.2.4.1.1, com detecção nos comprimentos de onda de 255 nm e 305 nm, para a isoquercitrina e resveratrol, respectivamente.

3.2.4.2.2 Validação do método analítico

A validação do método analítico foi realizada com base nas diretrizes da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e da Conferência Internacional de Harmonização (ICH), quanto aos parâmetros de linearidade, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), precisão e exatidão (BRASIL, 2017; ICH, 2005).

3.2.4.2.2.1 Linearidade

A linearidade do método foi determinada por meio da construção de três curvas analíticas de cada padrão em três dias diferentes. Para isso, foram preparadas soluções estoques de RES em etanol e de ISO em uma mistura de água e acetonitrila (98:2, v/v), ambas na concentração de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Estas soluções foram diluídas com a mistura de água e acetonitrila para obter soluções dos padrões nas concentrações de 0,2-4,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (RES) e 5,0-12,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (ISO). As soluções padrões foram filtradas em membrana de PVDF 0,22 μm (Agilent, Canadá) e injetadas no cromatógrafo. Curvas de área de pico *versus* concentração foram construídas e a equação da reta e o coeficiente de regressão (r) foram determinados pelo método dos mínimos quadrados.

3.2.4.2.2.2 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram cálculos através das Equações 5 e 6:

$$LD = \frac{DP_i \times 3,3}{IC} \quad \text{Equação 6}$$

$$LQ = \frac{DP_i \times 10}{IC} \quad \text{Equação 7}$$

onde, DP_i corresponde ao desvio padrão do intercepto com o eixo y obtido a partir das três curvas de calibração e IC à inclinação da reta (BRASIL, 2017).

3.2.4.2.2.3 Precisão

A precisão do método foi avaliada através dos ensaios de repetibilidade (precisão intradia) e precisão intermediária (interdia). A repetibilidade foi avaliada pela análise de uma solução da FAE 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em sextuplicata no mesmo dia. A precisão intermediária foi avaliada pela análise da solução da FAE 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em sextuplicata e em três dias diferentes. A precisão foi expressa pelo desvio padrão relativo (DPR %) entre as análises.

3.2.4.2.2.4 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada pela adição de 200 μL das soluções padrões de resveratrol (0,2 – 0,7 – 3,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e isoquercitrina (7,0 – 9,0 – 11,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) como níveis baixo, médio e alto em 200 μL da solução da FAE 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As análises foram realizadas em triplicata e a exatidão do método foi estimada pela recuperação percentual (R%) dos compostos fenólicos analisados na FAE.

3.2.5.3.5.1 Especificidade

A especificidade do método cromatográfico para determinação da isoquercitrina e resveratrol na FAE foi avaliada pela pureza dos picos.

3.2.5 Desenvolvimento das nanoemulsões contendo a FAE

3.2.5.1 Preparo das nanoemulsões brancas

As nanoemulsões brancas (NE_B) foram preparadas pela técnica de emulsificação espontânea descrita por Bouchemal e colaboradores (2004), com modificações. Basicamente, os óleos (TCM, rícino e semente

de uva) foram pesados em um cálice. Uma alíquota de uma solução de lecitina de soja em etanol foi adicionada e o volume completado com etanol ou acetona. A solução resultante (fase orgânica) foi vertida sob agitação magnética em 40 mL de uma solução aquosa de Tween® 80. As dispersões coloidais formadas foram mantidas sob agitação magnética por 5 minutos (TCM e rícino) ou agitação ultrassônica por 1 minuto (semente de uva) e, em seguida, submetidas à evaporação sob pressão reduzida para eliminação do solvente e concentração até o volume final de 20 mL. A composição das formulações testadas é apresentada na Tabela 3. Todas as formulações foram preparadas em triplicata.

3.2.5.2 Preparo das nanoemulsões contendo FAE

A partir dos resultados obtidos nas formulações descritas na Tabela 3, selecionou-se uma formulação de cada óleo para continuidade do trabalho. As nanoemulsões foram preparadas conforme descrito em 3.2.5.1, com adição de 1 mL de uma solução etanólica da fração acetato de etila na concentração 50 mg mL⁻¹ na fase orgânica, conforme Tabela 2.

Tabela 2 - Composição das nanoemulsões contendo a fração acetato de etila (NE-FAE) do bagaço de uva.

		NE-FAE _{TCM}	NE-FAE _{OR}	NE-FAE _{OSU}
Fase orgânica	TCM ^a (mg)	700	-	-
	OR ^b (mg)	-	700	-
	OSU ^c (mg)	-	-	700
	Lecitina de soja (mg)	20	20	20
	FAE (mg)	50	50	50
	Etanol q.s.p. (mL)	30	30	-
	Acetona q.s.p. (mL)	-	-	30
Fase aquosa	Tween® 80 (mg)	200	200	200
	Água purificada q.s.p. (mL)	40	40	40

^aTCM: triglicerídeos de cadeia média; ^bOR: óleo de rícino, ^cOSU: óleo de semente de uva.

Tabela 3 - Composição das nanoemulsões brancas (NE_B).

	Fase orgânica					Fase aquosa		
	TCM ^a (mg)	OR ^b (mg)	OSU ^c (mg)	Lecitina de soja (mg)	Etanol q.s.p. (mL)	Acetona q.s.p. (mL)	Tween [®] 80 (mg)	Água q.s.p. (mL)
NE _{B1}	700	-	-	7	20	-	200	40
NE _{B2}	-	700	-	7	20	-	200	40
NE _{B3}	700	-	-	40	20	-	200	40
NE _{B4}	-	700	-	40	20	-	200	40
NE _{B5}	700	-	-	20	20	-	200	40
NE _{B6}	700	-	-	20	20	-	400	40
NE _{B7}	700	-	-	20	30	-	200	40
NE _{B8}	700	-	-	20	30	-	400	40
NE _{B9}	-	700	-	20	20	-	200	40
NE _{B10}	-	700	-	20	20	-	400	40
NE _{B11}	-	700	-	20	30	-	200	40
NE _{B12}	-	700	-	20	30	-	400	40
NE _{B13}	-	-	700	20	-	20	200	40
NE _{B14}	-	-	700	20	-	20	400	40
NE _{B15}	-	-	700	20	-	30	200	40
NE _{B16}	-	-	700	20	-	30	400	40

^aTCM: triglicerídeos de cadeia média; ^bOR: óleo de rícino, ^cOSU: óleo de semente de uva.

3.2.5.3 Caracterização físico-química das nanoemulsões

3.2.5.3.1 Determinação do pH

O pH das formulações foi determinado em potenciômetro previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0.

3.2.5.3.2 Determinação do diâmetro médio, distribuição granulométrica e potencial zeta

O diâmetro médio e a distribuição granulométrica foram determinados por espectroscopia de correlação fotônica e o potencial zeta por anemometria laser Doppler, utilizando o equipamento Zetasizer Nano. As análises foram realizadas a 25° C após diluição apropriada das amostras com água ultrapura (Milli-Q®, Millipore, EUA). A análise do tamanho e distribuição granulométrica foi realizada em ângulo fixo de 173°. Para determinação do potencial zeta, as amostras foram colocadas em células eletroforéticas, onde um potencial de ± 150 mV foi estabelecido. Os valores de potencial zeta foram calculados a partir dos valores de mobilidade eletroforética, empregando a equação de Smoluchowski (SZE et al., 2003).

3.2.5.3.3 Avaliação da morfologia das nanoemulsões

As características morfológicas das nanoemulsões foram avaliadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), utilizando um microscópio JEM-1011-100 kv (Tóquio, Japão) no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC (LCME). As amostras foram depositadas em *grids* de cobre de 200-mesh revestidos com carbono, coradas com uma solução de ácido fosfotúngstico 0,5 % (m/V) e secas à temperatura ambiente. As amostras foram visualizadas em aumentos de 15.000 a 120.000 vezes.

3.2.5.3.4 Determinação do teor e eficiência de encapsulação de compostos fenólicos totais nas nanoemulsões

Para a determinação do teor de compostos fenólicos totais, uma alíquota de 0,1 mL das formulações NE-FAE_{TCM} e NE-FAE_{OR} foram transferidas para balões volumétricos de 10,0 mL e o volume final completado com etanol. Quando a NE-FAE_{OSU} foi testada, 0,1 mL da nanoemulsão foi transferida para balão volumétrico de 10,0 mL, foi

adicionado 1,0 mL de DMSO para completa solubilização da formulação e o volume final foi completado com etanol. O teor de compostos fenólicos totais foi determinado por espectrofotometria de absorção no visível, conforme metodologia descrita em 3.2.2.2.2. Todas as análises foram realizadas em triplicata, e os resultados expressos em miligramas equivalentes de ácido gálico por mililitro da nanoemulsão.

Para determinação da eficiência de encapsulação (EE%), uma alíquota de 0,4 mL de cada uma das formulações NE-FAE_{TCM}, NE-FAE_{OR} e NE-FAE_{OSU} foram colocadas em unidades de ultrafiltração Amicon® Ultra (100 kDa, Merck Millipore, Irlanda) e centrifugadas a 6200 rpm por 5 minutos. A concentração de compostos fenólicos no ultrafiltrado foi analisada conforme metodologia descrita no item 3.2.2.2.2. A EE% foi estimada como sendo a diferença percentual da quantidade de compostos fenólicos totais presente nas formulações e a quantidade encontrada no ultrafiltrado. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3.2.5.3.5 Determinação do teor e eficiência de encapsulação de isoquercitrina e resveratrol nas nanoemulsões

O teor e eficiência de encapsulação de isoquercitrina e resveratrol nas nanoemulsões foi avaliado usando metodologia analítica de CLAE-DAD previamente validada. Para a determinação dos compostos isoquercitrina e resveratrol nas nanoemulsões, uma alíquota de 0,5 mL das formulações NE-FAE_{TCM} e NE-FAE_{OR} foram transferidas para balões volumétricos de 5,0 mL e o volume final completado com etanol. Quando a formulação NE-FAE_{OSU} foi testada, 0,5 mL desta formulação foi adicionada a um balão volumétrico de 5,0 mL, 1,0 mL de DMSO foi adicionado para completa dissolução da nanoemulsão e o volume final completado com etanol. As misturas foram agitadas vigorosamente em vórtex por 2 min, filtradas e injetadas no cromatógrafo. Todas as amostras foram analisadas em triplicata e o teor expresso em microgramas de isoquercitrina e resveratrol por mililitro de nanoemulsão.

Para determinação da eficiência de encapsulação (EE%), os ultrafiltrados obtidos em 3.2.5.3.4 foram injetados no cromatógrafo e analisados nas mesmas condições. A EE% foi estimada como sendo a diferença percentual da quantidade de compostos isoquercitrina e resveratrol presente nas formulações e a quantidade encontrada no ultrafiltrado. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3.2.5.3.5.1 Avaliação da especificidade do método CLAE-DAD

A especificidade do método cromatográfico para determinação da isoquercitrina e resveratrol nas nanoemulsões foi previamente avaliada pela injeção de soluções obtidas a partir das nanoemulsões brancas no cromatógrafo e monitoramento dos perfis cromatográficos na faixa de comprimento de onda de 200 a 400 nm. Adicionalmente, a pureza dos picos de isoquercitrina e resveratrol nas nanoemulsões contendo FAE foi avaliada.

3.2.5.4 Estudos de estabilidade das nanoemulsões

A estabilidade das nanoemulsões brancas e contendo a fração acetato de etila foram avaliadas após armazenamento em temperatura ambiente 25 °C (TA) e refrigeração 4 °C (GE) durante um período de 30 dias, protegidas da luz. Nos tempos 0, 7, 15 e 30 dias foram coletadas alíquotas das formulações e avaliados os parâmetros de tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta, pH e teor de compostos fenólicos totais.

A estabilidade acelerada das formulações foi avaliada utilizando-se uma centrífuga analítica do tipo LUMiSizer® no Laboratório Interdisciplinar para o Desenvolvimento de Nanoestruturas (LINDEN). Para a análise foram colocados 400 µL de cada amostra em células óticas de policarbonato e submetidas à rotação de 4000 rpm durante 5000 s, a uma temperatura de 25 °C com leituras em intervalo de 10 s. A estabilidade das formulações foi avaliada por meio do perfil de transmissão tempo *versus* espaço obtido e pelo índice de instabilidade, dado que atribui menor tendência à ocorrência de fenômenos de instabilidade quando mais próximo de zero.

3.2.6 Avaliação da atividade antioxidante

3.2.6.1 Método DPPH

A atividade antioxidante da fração acetato de etila e das nanoemulsões foi avaliada pelo método do sequestro do radical DPPH descrito por Choi e colaboradores (2002). Para as análises, soluções etanólicas da FAE foram obtidas na faixa de concentração de 4,0 a 20,0 µg mL⁻¹. Para avaliação do potencial antioxidante das nanoemulsões, 2,0 mL das formulações NE-FAE_{TCM} e NE-FAE_{OR} foram transferidos para balões volumétricos de 10,0 mL e o volume final foi completado com etanol. Para a formulação NE-FAE_{OSU}, uma alíquota de 2,0 mL da

formulação foi transferida para balão volumétrico de 25,0 mL com 2,0 mL de hexano e o volume final completado com etanol. Estas soluções foram diluídas de modo a obter soluções com concentração da FAE na faixa de 2,0 a 26,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Para a avaliação da atividade antioxidante, uma alíquota de 2,5 mL de cada uma das soluções foi transferida para tubos de ensaio e 1,0 mL de uma solução de DPPH 0,3 mM em etanol foi adicionado. As amostras foram deixadas reagir durante 30 minutos ao abrigo de luz e, em seguida, as absorbâncias das mesmas foram lidas a 518 nm, utilizando etanol para zerar o equipamento. Uma mistura de etanol: água (2,5: 1,0 v/v) foi utilizado como branco, ácido gálico foi empregado como controle positivo, em concentrações de 0,1 a 3,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e uma solução de DPPH preparada na ausência das amostras foi empregada como controle negativo. O percentual de redução do radical DPPH• foi estimado usando a Equação 7, onde Abs corresponde às absorbâncias obtidas para a amostra, branco e controle negativo.

$$\% \text{ redução DPPH} = 100 - \frac{Abs_{amostra} - Abs_{branco} \times 100}{Abs_{controle\ negativo}} \quad \text{Equação 8}$$

Gráficos de percentual de DPPH reduzido versus concentração das amostras $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram construídos e os valores de EC_{50} (concentração necessária para reduzir em 50% a quantidade inicial de DPPH•) foram obtidos a partir da análise da regressão linear. As análises foram realizadas em triplicata.

3.2.6.1 Método FRAP

A atividade antioxidante da fração acetato de etila e das nanoemulsões também foi avaliada pela determinação do poder de redução do íon ferro (FRAP), descrito por Benzie & Strain (1996), com modificações. O reagente de trabalho FRAP foi preparado a partir da mistura das soluções tampão acetato de sódio 0,3 M, TPTZ 10 mM e cloreto férrico 20 mM na proporção 10:1:1 (v/v/v). Para a construção de uma curva padrão, uma solução etanólica de ácido gálico a 25,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foi preparada. Esta solução foi diluída pela adição de 75 μL de água e volume variáveis de etanol de modo a obter 0,175 mL de soluções de ácido gálico na faixa de concentração de 0,1 a 1,0 μg em massa. A estas soluções, 1,375 mL do reagente FRAP foi adicionado e as misturas foram incubadas a 37 °C por 15 minutos. Em seguida, as soluções foram lidas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 593.

Para determinação do potencial antioxidante da FAE, foram preparadas diluições nas concentrações de 0,4-2,0 µg em massa e as leituras realizadas conforme descrito para o padrão. As nanoemulsões foram avaliadas em concentrações de 0,01-7,7 µg em massa da FAE. Para ambas as amostras o potencial antioxidante FRAP foi expresso em µg FAE equivalente a 0,375 µg do padrão de ácido gálico.

3.2.7 Avaliação da permeação e retenção cutânea *in vitro* dos compostos isoquercitrina e resveratrol em modelo bicompartimental de células de Franz

3.2.7.1 Avaliação da solubilidade dos compostos fenólicos totais no meio receptor

Com intuito de avaliar o meio receptor para os estudos de permeação cutânea, a solubilidade dos compostos fenólicos totais foi avaliada pela adição de um excesso de FAE em 5,0 mL de uma solução etanol: água (25:75). A mistura foi mantida sob agitação mecânica por 24 horas e o teor de compostos fenólicos totais avaliado conforme metodologia descrita 3.2.2.2.2.

3.2.7.2 Preparação das membranas

Para realização dos estudos de permeação e retenção cutânea foi utilizada pele de orelha suína como modelo de membrana, obtidas em um matadouro local (Antônio Carlos, SC). As orelhas obtidas eram desprovidas de pelos e não apresentavam danos no tecido, como cortes ou perfurações. As orelhas de porco foram lavadas com água corrente, secas com papel absorvente e congeladas individualmente a -20 °C, até o início dos experimentos.

No dia anterior ao experimento, as orelhas foram descongeladas e cortes circulares foram realizados, separando o dorso da pele da cartilagem com auxílio de um bisturi, e removendo a gordura excedente, a fim de obter uma melhor homogeneidade na espessura da pele (em torno de 1 mm). Os cortes foram colocados entre o compartimento doador e receptor da célula de Franz com área de interface de 1,52 cm², com a parte interna da pele voltada para a porção interior da célula. Depois de montadas as células, as peles foram hidratadas com tampão fosfato pH 7,4, *overnight* e sob refrigeração (4 °C).

3.2.7.3 Cinética de permeação cutânea

No dia do experimento, as células de Franz foram retiradas do refrigerador e o tampão foi descartado. Para os experimentos, utilizou-se 11 mL do meio receptor na câmara receptora e 500 μL das formulações (contendo cerca de $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ FAE), das NE_{BR} ou da FAE (solução $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ em água, a partir de uma solução estoque diluída em etanol) no compartimento doador. O sistema foi mantido sob agitação magnética em banho termostatizado a $37 \pm 1,0 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 8 horas. Após o início da cinética, alíquotas foram coletadas em tempos pré-determinados com reposição do meio para posterior análise por CLAE-DAD conforme metodologia descrita abaixo. Todos os ensaios foram realizados em sextuplicata.

3.2.7.4 Estudos de retenção cutânea

A retenção da isoquercitrina na pele foi determinada no final do estudo de permeação. Inicialmente, o excesso de formulação ou FAE foi removido utilizando um algodão, o qual foi transferido para tubos tipo Falcon e acrescidos de 5 mL de uma solução de DMSO:ACN (1:1 v/v) para extração dos compostos. A retenção no estrato córneo (EC) foi avaliada utilizando a técnica de *tape-stripping*. As peles foram fixadas em uma superfície lisa e com o EC voltado para cima e, em seguida, foram aplicadas 15 fitas adesivas (Veltape - 48mm x 30m) sobre as mesmas, sendo a primeira fita desprezada (ESCOBAR-CHÁVEZ et al., 2008). Em cada aplicação a pele foi pressionada com um peso de 500 g por 15 segundos para auxiliar na remoção desta camada. Da mesma forma, as fitas foram extraídas com 10 mL de uma solução de DMSO:ACN (1:1 v/v). Para análise da isoquercitrina retida na epiderme e derme, a pele foi picotada com auxílio de uma tesoura, transferida para tubos tipo Falcon e a extração foi realizada pela adição de 5 mL da solução de DMSO:ACN (1:1 v/v). Todas as amostras foram homogeneizadas em homogeneizador ultrassônico por 1 minuto, colocadas em banho ultrassom por 60 minutos, e filtradas em membranas de PVDF 0,2 mm. As soluções resultantes foram analisadas por CLAE-DAD nas condições descritas abaixo. A quantidade de compostos retidos foi expressa em $\mu\text{g cm}^2$.

3.2.7.5 Validação do método analítico CLAE-DAD para determinação da isoquercitrina nos estudos de permeação e retenção cutânea

A determinação da isoquercitrina nos estudos de permeação e retenção foi realizada em um sistema de cromatografia líquida de alto desempenho (UFLC Prominence, Shimadzu, Japão) (CENTRALCROM, UFSC), equipado com uma bomba binária LC-20AD, auto-injetor SIL-20AC HT, forno de coluna CTO-20A e detector de arranjo de fotodiodos SPD-M20 (DAD). As condições cromatográficas foram as mesmas descritas no item 3.2.4.1.1 e o método foi revalidado quanto aos parâmetros de linearidade, limites de detecção e quantificação e especificidade.

A linearidade do método foi determinada pela construção de três curvas analíticas de isoquercitrina em três dias diferentes. Uma solução estoque do padrão foi preparada em uma mistura de água e acetonitrila (98:2; v/v) na concentração de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ e diluída para obter concentrações na faixa de concentração de $0,05 - 4,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. As soluções padrões foram filtradas em membrana de PVDF $0,22 \mu\text{m}$ (Agilent, Canadá) e injetadas no cromatógrafo. Curvas de área do pico *versus* concentração foram então construídas e a equação da reta e o coeficiente de regressão (r) foram determinados pelo método dos mínimos quadrados e os limites de detecção e quantificação foram calculados através das Equações 6 e 7 a partir das curvas padrões.

A especificidade do método cromatográfico foi avaliada pela injeção das amostras obtidas no experimento de permeação e retenção cutânea das nanoemulsões brancas, através do monitoramento dos perfis cromatográficos no comprimento de onda de 255 nm.

3.2.8 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software Graph-Pad Prism. Os resultados foram considerados significantes quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

O bagaço de uva é constituído de água, proteínas, lipídios, vitaminas, carboidratos, fibras, minerais e compostos com atividade biológica, os quais a diversidade é dependente de fatores como a colheita, condições climáticas, técnicas de extração e variedade (GALANAKIS, 2017). Rockenbach (2008) avaliou a atividade antioxidante *in vitro* e o teor de compostos fenólicos do bagaço de uvas tintas das variedades Cabernet Sauvignon e Merlot (*Vitis vinífera* L.) e Bordô e Isabel (*Vitis labrusca* L.), coletados na região de Videira, Santa Catarina, na safra 2006/2007. Este autor encontrou um maior teor de compostos fenólicos totais (74,75 mg g⁻¹) e maior atividade antioxidante para a variedade Cabernet Sauvignon, em comparação às demais variedades. Assim, o bagaço de uva da variedade Cabernet Sauvignon foi selecionado para a realização deste trabalho.

O bagaço de uva da variedade Cabernet Sauvignon (*Vitis vinífera* L.) foi coletado antes do processo de fermentação, no mês de abril de 2017 em São Joaquim, Santa Catarina, e apresentou o teor de umidade de 69,36% ($\pm 0,79$). De acordo com o manual de subprodutos de processamento de uva, cerca de 50 a 75% do bagaço de uva corresponde a água (GALANAKIS, 2017), estando de acordo com o encontrado neste trabalho. A determinação de umidade é importante, pois o bagaço de uva é altamente perecível, devido ao elevado teor de umidade e à atividade da água (GOULA; THYMIATIS; KADERIDES, 2016). Além disso, neste trabalho essa determinação foi importante para considerar o teor de água na obtenção da solução extrativa quando o bagaço de uva sem secagem (BSS) foi empregado.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS SOLUÇÕES EXTRATIVAS

Com intuito de obter uma solução extrativa com elevado teor de compostos bioativos, o efeito da secagem da matéria-prima sobre a sua composição química foi avaliado. Assim, o material de partida empregado na preparação das soluções extrativas foi processado por três protocolos diferentes: bagaço sem secagem (BSS), bagaço seco em estufa a temperatura de 50 °C por 48 horas (BSE) e bagaço seco pela técnica de liofilização (BL), os quais geraram as soluções extrativas SE_{BSS}, SE_{BSE} e SE_{BL}, respectivamente.

As soluções extrativas obtidas a partir do bagaço de uva foram caracterizadas quanto ao resíduo seco, teor de compostos fenólicos totais e antocianinas monoméricas totais. Os resultados obtidos na caracterização das diferentes SE_s estão demonstrados na Tabela 4.

Tabela 4 - Resíduo seco, teor de compostos fenólicos totais e antocianinas monoméricas totais das soluções extrativas obtidas a partir do bagaço de uva.

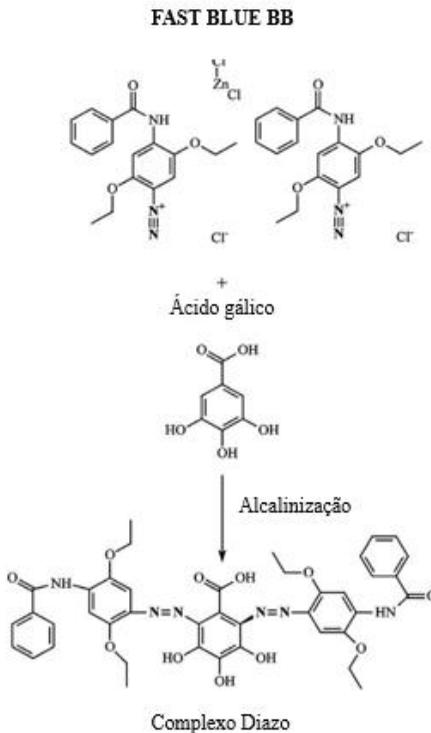
SE	Resíduo Seco (RS %)	Teor de fenóis totais (mg mL ⁻¹) ¹	Teor de antocianinas totais (mg mL ⁻¹) ²
SE _{BSS}	3,03 (± 0,08) ^a	1,57 (± 0,02) ^a	0,28 (± 0,02) ^a
SE _{BSE}	7,88 (± 0,17) ^b	3,54 (± 0,09) ^b	0,35 (± 0,02) ^b
SE _{BL}	7,99 (± 0,47) ^b	3,64 (± 0,04) ^b	0,65 (± 0,03) ^c

¹Resultados expressos em mg equivalente de ácido gálico. ²Resultados expressos em mg equivalente de cianidina-3-glicosídeo. Considerando cada uma das determinações separadamente, letras diferentes representam diferença estatística significativa (ANOVA, seguido do pós-teste Tukey; p < 0,05).

Como pode ser observado, mesmo considerando a água presente no bagaço de uva como parte do solvente de extração, a SE_{BSS} foi solução extrativa que apresentou o menor teor de resíduo seco, ou seja, da quantidade de compostos extraíveis nas condições de maceração utilizadas. Esse resultado pode ser justificado pelo fato de que a matéria-prima não passou pelo processo de trituração, isto é, a extração foi feita com o material *in natura*, o que pode ter dificultado a interação com o solvente e, conseqüentemente, a efetiva extração de compostos. Por outro lado, quando o BSE e BL foram testados, os valores de resíduo seco não diferiram estatisticamente entre si.

O teor de compostos fenólicos totais foi avaliado pelo método colorimétrico baseado na reação entre o sal de diazônio Fast Blue BB e os compostos fenólicos, que ocorre em meio alcalino e resulta na formação de complexos estáveis do tipo “azo” (Figura 10), os quais podem ser quantificados por espectrofotometria de absorção no visível a 420 nm (MEDINA, 2011a). Essa técnica apresenta como vantagem a eliminação de possíveis interferentes não fenólicos como o ácido ascórbico, açúcares, amins aromáticas, ácidos orgânicos e ferro, relatados em outros métodos comumente utilizados como o Folin-Ciocalteu (LESTER et al., 2012; MEDINA, 2011b; PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

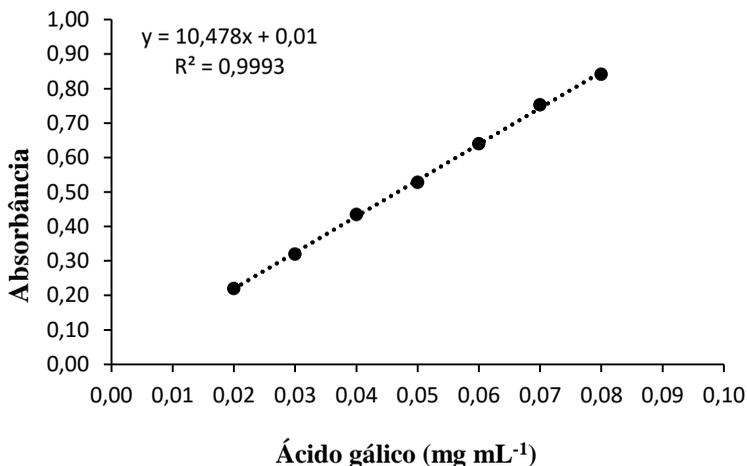
Figura 10 - Interação proposta entre o sal de diazônio Fast Blue BB e o ácido gálico.



Fonte: Adaptado de Medina (2011b)

O resultado para teor de fenóis totais foi expresso em equivalente de ácido gálico. Para isto uma curva de calibração de ácido gálico em etanol foi construída na faixa de concentração de 0,02 a 0,08 mg mL⁻¹ (Figura 11). A curva de calibração exibiu coeficiente de correlação de 0,9996 (r) e equação da reta de $y = 0,0105x + 0,01$, mostrando a linearidade do método na faixa de concentração testada. Semelhante aos resultados de resíduo seco, o teor de compostos fenólicos totais foi mais baixo quando a solução extrativa foi preparada com o bagaço sem secagem (SE_{BSS}), mas não diferiu estatisticamente quando as soluções extrativas foram preparadas com o bagaço seco em estufa (SE_{BSE}) e o bagaço liofilizado (SE_{BL}).

Figura 11- Curva de calibração do ácido gálico para determinação de compostos fenólicos totais pelo método Fast Blue BB.



O teor de antocianinas monoméricas totais foi avaliado pelo método do pH diferencial. Esse método é baseado nas transformações estruturais que os pigmentos de antocianinas sofrem com a mudança de pH, manifestando-se por diferentes espectros de absorção. Basicamente são efetuadas leituras espectrofotométricas da amostra em uma solução de cloreto de potássio 0,025 M, pH 1,0 em que os pigmentos de antocianinas exibem coloração intensa, e em uma solução de acetato de sódio 0,4 M, pH 4,5, onde praticamente não apresentam coloração, e portanto, menor absorção de energia. A diferença nas leituras dos λ permite estimar a fração real de antocianinas presentes na amostra (GIUSTI; WROLSTAD, 2001; TEIXEIRA; STRINGHETA; OLIVEIRA, 2008). Diferente do teor de fenóis totais, o teor de antocianinas foi afetado pelo método de secagem realizado, sendo o maior teor obtido para a SE_{BL} (Tabela 4). Segundo a literatura, diversos fatores podem influenciar na estabilidade das antocianinas, dentre eles o pH, temperatura e a presença de oxigênio. Neste caso, sobretudo quando comparado à SE-BSE, a obtenção do maior teor de antocianinas totais na SE-BL pode estar relacionada com o uso de temperaturas mais baixas neste processo de secagem. A degradação das antocianinas frente a temperatura está ligada ao grau de acilação desses compostos em temperatura elevada, à hidrólise e às reações de oxidação

(CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009; LARSEN, 2017; LOPES et al., 2007; ZHAO et al., 2017).

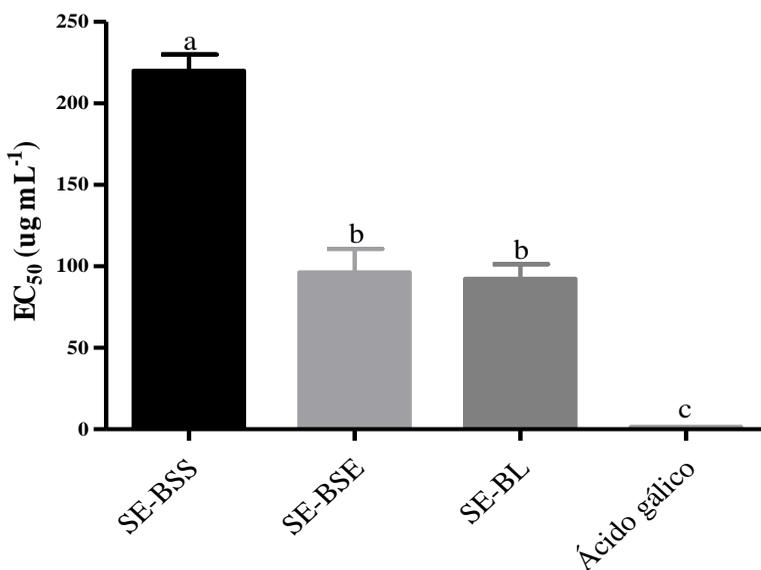
As SE foram avaliadas ainda quanto à atividade antioxidante pelo método DPPH. O radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH[•]) é caracterizado por apresentar um radical livre estável, devido à deslocalização do elétron desemparelhado por toda a molécula. Esta deslocalização confere ao DPPH[•] uma coloração violeta, caracterizada por uma banda de absorção em etanol em cerca de 518 nm. Pela ação de um antioxidante, o DPPH[•] é reduzido, formando uma hidrazina que apresenta coloração amarela, com conseqüente decréscimo da absorção (OLIVEIRA, 2015). Compostos fenólicos encontrados nas plantas são amplamente conhecidos pela capacidade de redução do radical DPPH[•]. Neste trabalho, o efeito do processamento da matéria-prima sobre a atividade antioxidante das soluções extrativas foi avaliado. Estes resultados foram expressos como concentração necessária para reduzir em 50% (EC₅₀) o radical DPPH[•] e estão demonstrados na Figura 12. O maior valor de EC₅₀ foi obtido para a SE_{BSS} (210,16 ± 17,09) como poderia ser esperado, visto que o teor de compostos fenólicos foi mais baixo para esta solução extrativa. Por outro lado, a EC₅₀ não variou quando as soluções extrativas preparadas a partir do bagaço em estufa (SE_{BSE}) e liofilizado (SE_{BL}) foram comparadas (96,40 ± 24,90 e 92,30 ± 15,70 µg mL⁻¹, respectivamente). Já o ácido gálico apresentou o menor valor de EC₅₀ (1,48 ± 0,03 µg mL⁻¹).

A partir dos resultados obtidos, a liofilização foi selecionada como técnica de secagem para posterior extração dos compostos fenólicos do bagaço de uva. A liofilização é uma técnica muito utilizada no processamento de alimentos, onde o produto é congelado e em seguida submetido a alto vácuo. A desidratação acontece por sublimação devido à ausência de água líquida a baixas temperaturas, obtendo-se assim um produto final com as características de qualidade preservadas (TORRES et al., 2015).

Por outro lado, a escolha do solvente é um dos fatores mais importantes que afetam a eficiência de extração. Os polifenóis têm natureza mais polar e podem ser solubilizados facilmente em meios polares como soluções hidroalcoólicas. Ainda, frações fenólicas podem ser obtidas usando misturas de solventes menos polares, como o acetato de etila (FONTANA; ANTONIOLLI; BOTTINI, 2013; GALANAKIS, 2017). Adicionalmente, estudos realizados por Campos e colaboradores (2008) e Louli, Ragoussis e Magoulas (2004) relataram que em extrações com solvente acetato de etila menores valores de EC₅₀ foram observados e os extratos permaneceram estáveis em relação a cor e atividade

antioxidante. Com base nisso, a SE_{BL} foi submetida ao fracionamento com o solvente acetato de etila a fim de concentrar compostos com características menos polares em relação à solução hidroalcoólica, que possivelmente apresentariam maior afinidade pelo núcleo lipofílico das nanoemulsões e levariam a maiores valores de eficiência de encapsulação.

Figura 12 - Valores de EC_{50} obtidos para as soluções extrativas e ácido gálico. Na figura, letras diferentes indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).



4.3 CARACTERIZAÇÃO DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (FAE)

4.3.1 Determinação do teor de compostos fenólicos totais e antocianinas monoméricas totais

A fração acetato de etila (FAE) foi obtida a partir da SE_{BL} conforme descrito em 3.2.3.1, e aprestou-se macroscopicamente como um extrato de consistência sólida e coloração violeta escura. A FAE apresentou um teor de compostos fenólicos totais de $42137,57 \pm 1331,19$,

expressos em mg de ácido gálico por 100 g, e de antocianinas monoméricas totais de $1946,87 \pm 83,07$, expressos em mg de cianidina-3-glicosídeo por 100 g de fração (Tabela 5).

Tabela 5 - Teores de fenóis totais e de antocianinas monoméricas totais obtidos para a SE_{BL} e FAE.

	SE _{BL} ^a		FAE ^b
	($\mu\text{g mL}^{-1}$)	($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$) ^c	($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$)
Fenóis Totais	$3,64 \pm 0,04$	$5015,97 \pm 52,12$	$42137,57 \pm 1331,19$
Antocianinas totais	$0,65 \pm 0,03$	$899,31 \pm 46,40$	$1946,87 \pm 83,07$

^aSolução extrativa obtida a partir do bagaço de uva liofilizado.

^bFração acetato de etila

^cExpresso por 100 g de resíduo seco da SE_{BL}.

A fim de comparar os resultados, os valores de teor de compostos fenólicos totais e antocianinas monoméricas totais da SE_{BL} foram calculados com base no teor de resíduo seco desta solução extrativa (3,03%, m/V). Assim, quando os valores destes compostos obtidos para a SE_{BL} foram comparados com aqueles obtidos para a FAE_{BL}, foi possível verificar que a etapa de fracionamento levou a um aumento em cerca de 8 vezes na concentração de fenóis totais e de cerca de 2 vezes no teor de antocianinas totais (Tabela 5). O fracionamento foi menos eficiente para extração de antocianinas, possivelmente pela característica mais polar desses compostos, apresentando maior solubilidade em água do que em solventes menos polares como o acetato de etila (LOPES et al., 2007).

Existem diversos estudos na literatura apresentando diferentes métodos de extração e análise da composição química de extratos obtidos a partir de amostras de uva, entretanto a comparação quantitativa entre eles é muito difícil em virtude das diferentes abordagens, sendo assim necessária uma padronização nas técnicas analíticas (BURIN et al., 2014; KAMMERER et al., 2004; LOULI; RAGOSSIS; MAGOULAS, 2004; MELO, 2010; PINTAĆ et al., 2018; ZAGKLIS; PARASKEVA, 2015). Burin e colaboradores (2014) relatam que as amostras de uva de modo geral passam por uma preparação prévia para concentração dos analitos ou eliminação de possíveis contaminantes para a coluna. Os métodos mais utilizados são a extração sólido-líquido e líquido-líquido, entretanto também não existe um consenso na literatura sobre parâmetros como tipo e volume de solvente e tempo de extração (BURIN et al., 2014;

TOMAZ et al., 2019). Similarmente aos nossos estudos, Denny e colaboradores (2014) avaliaram o teor de compostos fenólicos totais pelo método Folin-Ciocalteu de uma fração acetato de etila obtida a partir da extração líquido-líquido de uma solução extrativa etanólica do bagaço de uva da variedade *Petit Verdot*, e obteve um teor de 52945 mg equivalentes de ácido gálico por 100 mg da fração, mostrando igualmente que a fração acetato de etila permite concentrar os compostos fenólicos presentes no bagaço de uva.

4.4 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA PARA IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS NA FAE E NAS NANOEMULSÕES

4.4.1 Identificação dos compostos fenólicos

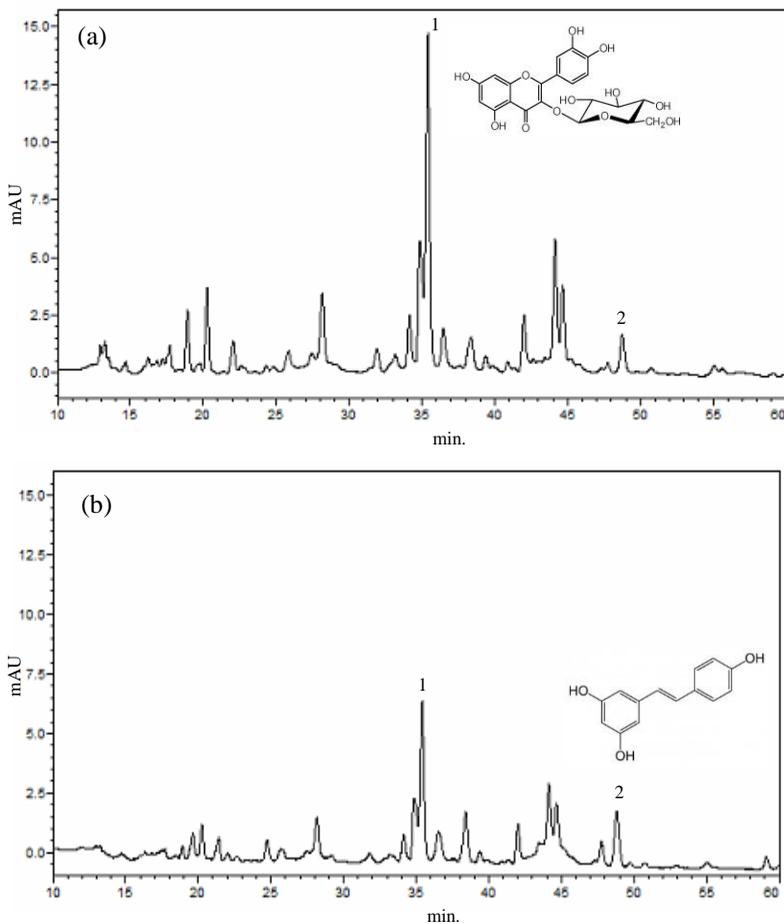
Apesar de diversos estudos relatarem a utilização de cromatografia líquida para separação e quantificação de compostos fenólicos do bagaço de uva, a reprodução de um método previamente desenvolvido é muito difícil em virtude da complexidade da matriz, cuja composição depende grandemente da variedade da uva e da tecnologia de vinificação. Antocianinas, flavonóis glicosilados, ácidos e alcoóis fenólicos e estilbenos são os principais constituintes fenólicos encontrados no bagaço, sendo estes associados aos efeitos benéficos da uva e do vinho à saúde (KAMMERER et al., 2004; PERESTRELO et al., 2012).

A técnica de cromatografia líquida combinando detector de arranjo de diodos e espectrometria de massas é uma das mais utilizadas na identificação e quantificação de compostos fenólicos nas mais diversas matrizes (AGREGÁN et al., 2017; BENAYAD; GÓMEZ-COROVÉS; ES-SAFI, 2014; KELEBEK, 2016; MATA et al., 2016; RAJAURIA; FOLEY; ABU-GHANNAM, 2016). O detector DAD permite a distinção das classes de compostos fenólicos com base no espectro UV-visível e absorção máxima dos picos, enquanto o MS/MS fornece informações sobre íons moleculares intactos e fragmentos de íons, demonstrando o peso molecular do composto e características estruturais, através da relação massa/carga (m/z) das moléculas ionizadas (ROCKENBACH et al., 2012).

Para o desenvolvimento do método analítico, diversas condições foram previamente testadas, incluindo diferentes proporções acetônitrila e solução de ácido fórmico na fase móvel, programas de gradiente de eluição e fluxo, com base nos estudos realizados por Kammerer e

colaboradores (2004) e Perestrelo e colaboradores (2012). A melhor separação dos picos foi obtida com a utilização de um gradiente conforme descrito em 3.2.4.1.1, e um fluxo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. A Figura 13 mostra os perfis cromatográficos obtidos após análise da FAE por CLAE-DAD, com detecção em dois diferentes comprimentos de onda.

Figura 13 - Cromatograma obtido no desenvolvimento do método analítico para identificação e quantificação dos compostos fenólicos na FAE com detecção a 255 nm (a) e 305 nm (b).



Como é possível visualizar na Figura 13, foi identificada a presença de um pico majoritário no tempo de retenção de 35,4 minutos e com absorção máxima em 255 nm. Com a utilização do software Data Analysis, dos bancos de dados online MetFrag, Pubchem e Massbank aliados à injeção de padrões foi possível identificar o pico majoritário como sendo a isoquercitrina, e ainda um segundo composto no tempo de retenção de 48,8 minutos e absorção máxima em 305 nm como sendo o resveratrol (2) (Tabela 6). Apesar da diversidade de picos visualizados nos cromatogramas, houve uma grande dificuldade na identificação destes pela complexidade da matriz vegetal, a qual apresenta em sua grande maioria compostos na forma glicosilada, os quais não possuíamos padrões disponíveis.

Tabela 6 - Identificação de compostos fenólicos na FAE com base no espectro de massas e injeção de padrões.

Composto	λ_{\max} (nm)	Tempo de retenção (min)		M-H ⁺ (m/z)	Fragmentos (m/z)
		FAE	Padrão		
(1) Isoquercitrina	255	35,4	35,4	463,0888	300,0277
(2) Resveratrol	305	48,8	48,8	227,0720	174,9571

A isoquercitrina (quercetina-3-O- β -glucopiranosídeo) é umas das principais formas glicosiladas do flavonol quercetina (VALENTOVÁ et al., 2014). Apesar de ser o glicosídeo de quercetina menos estudado, apresenta diversas atividades relatadas como antioxidante, anti-inflamatória, antifúngica, diurética e hepatoprotetora (GASPAROTTO JUNIOR et al., 2012; LI et al., 2011; ROGERIO et al., 2007; SILVA et al., 2009; XIE et al., 2016; YUN et al., 2015). Apresenta maior biodisponibilidade em relação a sua aglicona quercetina e tem mostrado exibir vários efeitos quimioprotetores *in vitro* e *in vivo* frente ao estresse oxidativo e câncer (VALENTOVÁ et al., 2014).

O resveratrol (3,5,4'-tridroxitrans-estilbeno) é um polifenol não-flavonóide, da classe dos estilbenos, amplamente estudado, produzido pelas plantas em resposta ao ataque de fungos e bactérias ou a exposição à radiação ultravioleta (HUANG et al., 2019). É relatado como o principal polifenol presente no vinho, com atividades antioxidante (GÜLÇİN, 2010), antienvelhecimento (ABBAS; KAMEL; EL-SAYED, 2018; KASIOTIS et al., 2013; KHAFAGA; NORELDIN; TAHA, 2019), anti-inflamatória (LI et al., 2019; MARTÍN et al., 2006), anticâncer (LI et al., 2010; NILES et al., 2003; TOMIC et al., 2013), cardioprotetora (LI; XIA;

FÖRSTERMANN, 2012; PENUMATHSA et al., 2007; TSAI et al., 2012; XI et al., 2009; ZHANG et al., 2018) entre outras.

Considerando que isoquercitrina, como composto majoritário, e resveratrol puderam ser identificados na FAE, estes compostos foram empregados para a validação do método analítico e como marcadores químicos de compostos fenólicos do bagaço de uva, nas nanoemulsões.

4.4.2 Validação do método analítico CLAE-DAD para determinação da isoquercitrina e resveratrol na FAE

4.4.2.1 Especificidade

A especificidade de um método analítico é definida como a capacidade deste em detectar o analito de interesse na presença de outros componentes da matriz (BRASIL, 2017). Para a determinação da isoquercitrina e do resveratrol na FAE, a especificidade foi avaliada pela verificação da pureza do pico obtida após varredura do padrão e da amostra, empregando detector DAD. O percentual de resposta ao se comparar a área dos picos do padrão e da FAE foi de 99% para ambos os compostos, indicando que o método é específico para a determinação da isoquercitrina e do resveratrol nesta matriz.

4.4.2.2 Linearidade e limites de detecção e quantificação

A linearidade de um método é a capacidade de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra, e deve ser avaliada em toda a faixa estabelecida para o método (BRASIL, 2017). O método desenvolvido para quantificação da isoquercitrina e resveratrol mostrou ser linear na faixa de concentração de 5,0 a 12,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e de 0,2 a 4,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($r > 0,999$) respectivamente (Figuras 15 e 16). As equações obtidas pela análise da regressão linear foram $y = 41224x + 2252$ e $y = 155758x - 11678$, para isoquercitrina e resveratrol, respectivamente.

Figura 14 - Curva de calibração da isoquercitrina.

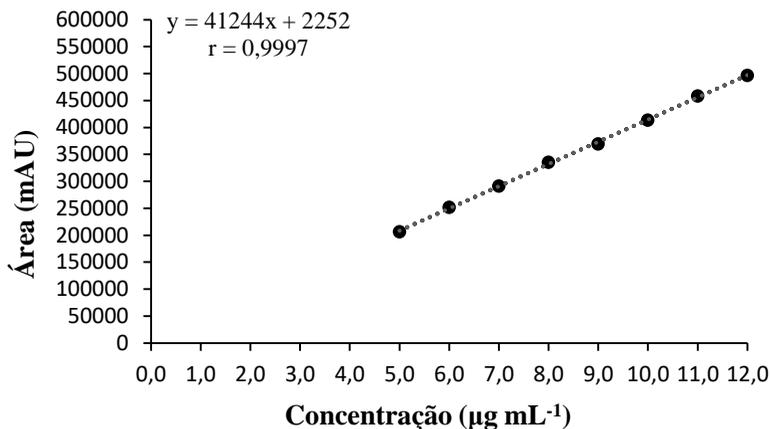
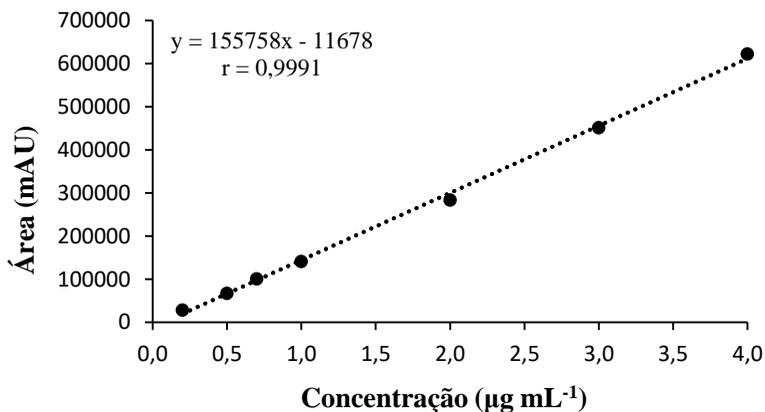


Figura 15 - Curva de calibração do resveratrol.



O limite de detecção (LD) é a menor quantidade do analito que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado nas condições experimentais estabelecidas. Já o limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito que pode ser determinada com precisão e exatidão nas condições estabelecidas (BRASIL, 2017). Os valores de LD e LQ foram determinados baseando-se nos parâmetros das curvas

analíticas e estão demonstrados na Tabela 7. Os valores encontrados indicaram que o método analítico é aceitável para detectar e quantificar a isoquercitrina e o resveratrol na FAE e nas nanoemulsões.

Tabela 7 - Limites de detecção e quantificação do isoquercitrina e resveratrol.

	Isoquercitrina ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Resveratrol ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
LD	0,302	0,051
LQ	0,916	0,154

4.4.2.3 Precisão

A precisão de um método indica a proximidade entre os resultados obtidos com a análise de amostra utilizando um método analítico validado e inclui a medida da repetibilidade ou precisão intradia e da precisão intermediária ou interdía. Os resultados obtidos na avaliação da repetibilidade e da precisão intermediária do método de CLAE-DAD para determinação da isoquercitrina e resveratrol na FAE estão mostrados nas Tabelas 8 e 9. Como pode ser observado, valores de DPR menores que 5% foram obtidos, evidenciando a precisão do método analítico.

4.4.2.4 Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais do método em relação ao aceito como verdadeiro. Neste estudo a exatidão do método foi avaliada a partir de adição de concentrações conhecidas dos padrões de isoquercitrina e resveratrol na solução contendo a FAE. Após análise a recuperação desses compostos fenólicos variou de 98,39% a 111,34, com valores de DPR (%) menores que 3,33 (Tabela 10), indicando que o método analítico apresenta concordância satisfatória entre os valores teóricos e os encontrados.

Tabela 8 - Resultados obtidos na avaliação de repetibilidade do método analítico para quantificação de isoquercitrina e resveratrol na FAE.

Repetições	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Média ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	DPR (%)
ISOQUERCITRINA			
1	6,63		
2	6,48		
3	6,53		
4	6,53	6,53	0,88
5	6,47		
6	6,52		
RESVERATROL			
1	0,41		
2	0,41		
3	0,41		
4	0,41	0,41	0,70
5	0,41		
6	0,41		

Tabela 9 – Resultados obtidos na avaliação da precisão intermediária do método analítico para quantificação de isoquercitrina e resveratrol na FAE.

Repetições	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			Média ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	DPR (%)
	Dia 1	Dia 2	Dia 3		
ISOQUERCITRINA					
1	6,63	6,33	6,76		
2	6,48	6,36	6,76		
3	6,53	6,60	6,87		
4	6,53	6,48	6,76	6,58	2,75
5	6,47	6,35	6,96		
6	6,52	6,48	6,48		
RESVERATROL					
1	0,41	0,42	0,42		
2	0,41	0,41	0,41		
3	0,41	0,42	0,42		
4	0,41	0,42	0,42	0,42	1,46
5	0,41	0,42	0,43		
6	0,41	0,42	0,43		

Tabela 10 – Resultados obtidos na avaliação da exatidão do método analítico para quantificação da isoquercitrina e resveratrol na FAE.

Concentração teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recuperação (%)	DPR (%)
ISOQUERCITRINA		
7,0	98,39	2,91
9,0	100,80	0,49
11,0	100,88	3,33
RESVERATROL		
0,2	111,34	1,10
0,7	102,80	1,75
3,0	105,75	1,30

4.5 DESENVOLVIMENTO DAS NANOEMULSÕES CONTENDO A FRAÇÃO ACETATO DE ETILA OBTIDA A PARTIR DO BAGAÇO DE UVA

4.5.1 Preparação e caracterização físico-química das nanoemulsões brancas

As nanoemulsões foram preparadas pelo método de emulsificação espontânea baseado na metodologia descrita por Bouchemal e colaboradores (2004). Neste método, uma fase orgânica contendo óleo, surfactante lipofílico e o fármaco a ser encapsulado, dissolvidos em um solvente orgânico miscível na água é adicionada a uma fase aquosa contendo um surfactante hidrofílico. O solvente orgânico rapidamente difunde-se na fase aquosa gerando uma turbulência interfacial (Efeito Marangoni) que leva à formação instantânea de uma emulsão apresentando tamanho de gota nanométrico (SAJJADI; JAHANZAD; BROOKS, 2002). Apensar da facilidade de obtenção, a otimização dos parâmetros de preparação das nanoemulsões torna-se necessária, uma vez que as características das formulações dependem de diversos fatores, como o tipo de solvente orgânico, a proporção entre as fases orgânica e aquosa, a viscosidade e volume do óleo, o tipo e concentração de tensoativo, entre outros (ALMEIDA; TEIXEIRA; KOESTER, 2008; BRUXEL et al., 2012).

Na etapa de desenvolvimento das formulações, nanoemulsões brancas (sem a FAE) foram inicialmente preparadas com o intuito de avaliar o efeito da composição da formulação sobre as características físico-químicas do sistema. Nesta etapa, três diferentes óleos foram

testados: triglicerídeos de cadeia média (TCM), óleo de rícino (OR) e óleo de semente de uva (OSU). A lecitina de soja foi empregada como surfactante lipofílico e o Tween 80 como surfactante hidrofílico, ambos testados em diferentes concentrações. As formulações testadas foram aquelas apresentadas na Tabela 3 (página 58) e os resultados obtidos na caracterização do tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta e pH estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 - Caracterização físico-químicas das nanoemulsões brancas (NE_B) quanto ao tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta e pH.

	Diâmetro médio (nm)	Índice de polidispersão	Potencial Zeta (mV)	pH
NE _{B1}	317,3 ± 52,6	0,37 ± 0,03	- 41,2 ± 1,9	6,22
NE _{B2}	352,4 ± 12,0	0,42 ± 0,05	- 43,8 ± 8,7	6,07
NE _{B3}	431,8 ± 200,2	0,44 ± 0,21	-36,2 ± 13,0	5,26
NE _{B4}	379,8 ± 108,7	0,42 ± 0,11	- 33,8 ± 7,4	5,03
NE _{B5}	382,6 ± 67,3	0,43 ± 0,05	-37,3 ± 0,3	5,56
NE _{B6}	410,7 ± 78,3	0,48 ± 0,12	-36,2 ± 0,2	4,72
NE _{B7}	313,9 ± 19,8	0,27 ± 0,04	-35,9 ± 6,1	6,30
NE _{B8}	369,3 ± 43,5	0,19 ± 0,03	-32,8 ± 4,2	4,36
NE _{B9}	310,2 ± 9,1	0,31 ± 0,01	-40,7 ± 1,3	4,44
NE _{B10}	381,9 ± 77,8	0,40 ± 0,06	-35,6 ± 2,1	4,48
NE _{B11}	278,8 ± 5,3	0,20 ± 0,07	-34,4 ± 2,1	4,98
NE _{B12}	310,9 ± 49,3	0,18 ± 0,01	-31,8 ± 1,3	4,93
NE _{B13}	291,2 ± 13,8	0,42 ± 0,03	-43,5 ± 3,8	5,99
NE _{B14}	312,2 ± 39,34	0,43 ± 0,02	-38,3 ± 0,8	5,26
NE _{B15}	260,2 ± 23,3	0,28 ± 0,04	-38,5 ± 1,9	6,00
NE _{B16}	257,1 ± 16,8	0,30 ± 0,05	-33,8 ± 2,5	5,20

O tamanho médio e a distribuição granulométrica são as características básicas mais importantes das nanoemulsões, as quais são determinadas pela técnica de espalhamento da luz ou espectroscopia de correlação fotônica. Essa técnica baseia-se na análise das flutuações de intensidade da luz espalhada em um determinado ângulo pelas partículas, devido ao movimento browniano das mesmas quando em dispersão (KLANG; VALENTA, 2011).

Como pode ser observado na Tabela 11, as formulações testadas apresentaram gotículas de tamanho nanométrico, com diâmetro médio variando entre 257,07 e 431,83 nm e índice de polidispersão entre 0,18 e 0,48, dependendo da composição da formulação. Considerando a adição de lecitina de soja na fase orgânica, o aumento da quantidade inicial deste surfactante pareceu aumentar o diâmetro médio das gotículas. Por exemplo, quando o TCM foi empregado como fase oleosa, as nanoemulsões preparadas com a adição de 7, 20 e 40 mg de lecitina apresentaram tamanhos de gotícula médios de 317,3, 382,6, e 431,8 nm, respectivamente (NE_{B1}, NE_{B5} e N_{B3}).

Para a continuidade dos estudos de formulação, as quantidades iniciais de óleo (700 mg) e de lecitina (20 mg) foram mantidas constantes, variando-se o volume de fase orgânica (20 ou 30 mL), a concentração de Tween 80 na fase aquosa (0,5 ou 1,0%), e o tipo de óleo (TCM, OR ou OSU) (NE_{B5} a NE_{B16}). Para este conjunto de formulações, o aumento do volume de fase orgânica de 20 para 30 mL conduziu à obtenção de nanoemulsões com tamanhos de gotículas e índice de polidispersão mais reduzidos, enquanto que o aumento na concentração de Tween 80 pareceu não afetar estas características. Assim, quando o TCM, OR e OSU foram testados, as formulações com valores mais baixos de tamanho e índice de polidispersão foram aquelas preparadas com Tween 80 na concentração de 0,5% e volume de fase orgânica de 30 mL (NE_{B7}, NE_{B11} e NE_{B15}, respectivamente).

Outro parâmetro comumente empregado para caracterizar nanoemulsões é o potencial zeta, o qual reflete o potencial elétrico superficial das gotículas que, por sua vez, é dependente do grau de ionização das moléculas presentes na interface óleo/água. Como pode ser observado na Tabela 11, todas as formulações apresentaram carga superficial negativa, a qual pode ser associada à presença de lipídeos carregados negativamente na lecitina, como fosfatidilinositol, fosfatidilserina e fosfatidilglicerol (SCHUH; BRUXEL; TEIXEIRA, 2014). O potencial zeta desempenha um papel importante na estabilização de emulsões, pois valores acima de 30 mV em módulo conduzem à repulsão entre as partículas (KLANG; VALENTA, 2011). Todas as formulações preparadas apresentaram potencial zeta maior que 30 mV, o que pode ser um indicativo de estabilidade destas preparações. Finalmente, o pH das nanoemulsões variou entre 4,3 e 6,3, sendo estes próximos ao pH fisiológico da pele e, portanto adequados para a administração tópica.

A partir dos resultados de tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta e pH, uma formulação de cada óleo (NE_{B7}, NE_{B11} e NE_{B15}) foi selecionada para encapsulação da FAE do bagaço de uva.

4.5.2 Preparação e caracterização físico-química das nanoemulsões contendo FAE

Após a seleção da composição das formulações, nanoemulsões contendo compostos fenólicos do bagaço de uva foram preparadas pela adição de 50 mg da FAE na fase orgânica da preparação. Estas formulações foram caracterizadas quanto ao tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta e pH, e os resultados estão demonstrado na Tabela 12. Quando as nanoemulsões contendo a FAE preparadas com TCM e OR são comparadas com as nanoemulsões brancas (NE_{B7} e NE_{B11}, respectivamente), é possível observar que a adição da fração levou à redução do diâmetro médio e índice de polidispersão. Efeito contrário foi verificado para as nanoemulsão preparada com OSU, em que a adição da FAE resultou no aumento do tamanho e índice de polidispersão, quando comparado com a nanoemulsão branca (NE_{B15}). Por outro lado, a adição da FAE não afetou o potencial zeta das formulações, as quais apresentaram carga superficial negativa e potencial zeta em módulo entre 30 e 40 mV. Os valores de pH na faixa de 4 a 5 foram obtidos para as nanoemulsões contendo a FAE.

Tabela 12 - Caracterização físico-química das nanoemulsões contendo a fração acetato de etila (NE-FAE) quanto ao tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta e pH.

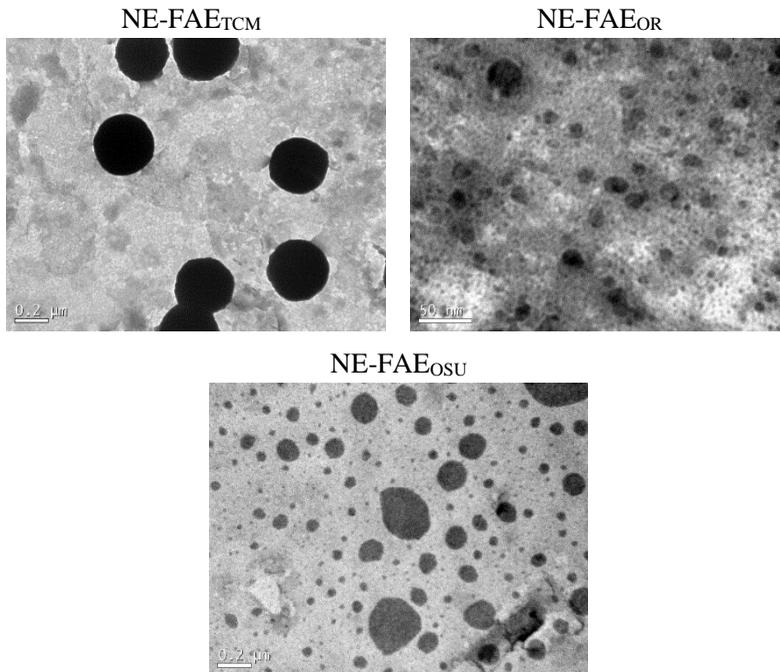
	Diâmetro médio (nm)	Índice de polidispersão	Potencial Zeta (mV)	pH
NE-FAE _{TCM}	272,0 ± 11,3	0,15 ± 0,01	- 37,4 ± 5,1	4,68
NE-FAE _{OR}	250,7 ± 23,7	0,16 ± 0,02	- 38,1 ± 1,7	4,33
NE-FAE _{OSU}	448,1 ± 105,1	0,36 ± 0,05	- 41,7 ± 1,8	4,55

4.5.3 Avaliação da morfologia das nanoemulsões

As imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão das nanoemulsões contendo a FAE (NE-FAE_{TCM}, NE-FAE_{OR} e NE-FAE_{OSU}) são mostradas na Figura 16. Gotículas esféricas podem ser observadas nas imagens de MET obtidas para as nanoemulsões preparadas com TCM e com formato mais irregular para as nanoemulsões preparadas com OR e

OSU. O tamanho das gotículas visualizadas por MET estão de acordo com os valores encontrados nas medidas por espalhamento de luz dinâmico (Tabela 12).

Figura 16 - Imagens obtidas por MET das nanoemulsões contendo a FAE.



4.5.4 Determinação do teor e eficiência de encapsulação de compostos fenólicos totais nas nanoemulsões

Os valores de teor e a eficiência de encapsulação dos compostos fenólicos totais, determinados após análise pelo método espectrofotométrico descrito em 3.2.5.3.4, encontram-se mostrados na Tabela 13. As nanoemulsões apresentaram teor de compostos fenólicos totais entre 2,6 e 2,9 mg mL⁻¹, não sendo, portanto, afetado pelo tipo de óleo empregado nas formulações. Igualmente, valores de eficiência de encapsulação próximos a 90% foram obtidos para todas as formulações. Neste caso, os elevados valores de eficiência de encapsulação indicam que os compostos fenólicos se encontram preferencialmente associados

às gotículas de nanoemulsão, evidenciando que o fracionamento da solução extrativa inicial (SE_{BL}) com acetato de etila permitiu a concentração de compostos lipofílicos do bagaço de uva com maior capacidade de serem veiculados por este nanocarreador lipídico.

Tabela 13 - Teor e eficiência de encapsulação de compostos fenólicos totais das nanoemulsões.

	Teor de compostos fenólicos totais (mg mL⁻¹)	Eficiência de encapsulação (%)
NE-FAE _{TCM}	2,90 ± 3,10	86,19 ± 1,54
NE-FAE _{OR}	2,78 ± 2,94	87,78 ± 0,25
NE-FAE _{OSU}	2,61 ± 0,46	87,11 ± 2,72

4.5.5 Determinação do teor e eficiência de encapsulação do resveratrol e isoquercitrina nas nanoemulsões

4.5.5.1 Avaliação da especificidade do método CLAE-DAD

A isoquercitina e resveratrol foram quantificados pelo método de CLAE-DAD desenvolvido, conforme descrito em 3.2.5.3.5 Este método mostrou ser linear, preciso e exato para quantificação destes compostos fenólicos na FAE. Para assegurar a aplicabilidade deste método analítico para quantificação da isoquercitrina e resveratrol nas nanoemulsões, a especificidade do método foi avaliada pela análise de soluções obtidas a partir das nanoemulsões brancas, nas mesmas condições cromatográficas. Os cromatogramas obtidos para as nanoemulsões brancas não apresentaram picos relativos à presença dos excipientes das formulações. Além disso, foi avaliada a pureza dos picos de isoquercitrina e resveratrol, após varredura do padrão e da amostra, empregando detector DAD. O percentual de resposta ao se comparar a área dos picos obtidos após injeção do padrão e das nanoemulsões foi de 99% para a isoquercitrina, indicando que o método é específico para a determinação deste composto. O índice de pureza do pico do resveratrol não pode ser determinado possivelmente pela menor intensidade do sinal do pico nas nanoemulsões (Tabela 14).

Tabela 14 - Índice de pureza dos picos cromatográficos de isoquercitrina e resveratrol.

	Pureza pico isoquercitrina (255 nm)	Pureza pico resveratrol (305 nm)
NE-FAE _{TCM}	0,99	ND
NE-FAE _{OR}	1,00	ND
NE-FAE _{OSU}	0,99	ND

ND – índice de pureza não detectado.

4.5.5.2 Determinação do teor e eficiência de encapsulação

Os valores de teor e eficiência de encapsulação de isoquercitrina e resveratrol nas nanoemulsões, após análise por CLAE-DAD, encontram-se mostrados na Tabela 15. Como pode ser verificado, o teor e eficiência de encapsulação de isoquercitrina e resveratrol não foram afetados pelo tipo de óleo empregado nas formulações. No entanto, a eficiência de encapsulação para a isoquercitrina foi de cerca de 75%, em contraste com os valores próximos a 100% obtidos para o resveratrol. Este resultado está provavelmente relacionado a maior polaridade da isoquercitrina, fazendo com que uma parte deste composto esteja solubilizado na fase dispersante da nanoemulsão.

Tabela 15 - Teor e eficiência de encapsulação dos marcadores químicos isoquercitrina e resveratrol nas nanoemulsões.

	Isoquercitrina		Resveratrol	
	Teor ¹	EE%	Teor ¹	EE%
NE-FAE _{TCM}	30,70 ± 0,36	75,88 ± 0,46	2,38 ± 0,05	94,70 ± 0,13
NE-FAE _{OR}	29,55 ± 0,17	75,49 ± 0,22	2,45 ± 0,01	96,11 ± 0,01
NE-FAE _{OSU}	29,29 ± 1,34	77,26 ± 1,61	2,39 ± 0,05	95,89 ± 0,10

¹ mg mL⁻¹

4.5.6 Avaliação da estabilidade das nanoemulsões contendo a FAE

4.5.6.1 Estabilidade frente à temperatura

Nanoemulsões são sistemas cineticamente estáveis cuja estabilidade é regida por diversas forças, incluindo a barreira mecânica entre as gotículas de óleo e a fase aquosa, formada pela presença dos

surfactantes na interface, ou pelas forças de repulsão eletrostática entre estas. Quando uma destas forças é rompida, fenômenos de instabilidade podem ocorrer, como a floculação, cremagem e coalescência das gotas, podendo chegar até a separação completa das fases oleosa e aquosa. A caracterização físico-química inicial desses sistemas pode fornecer uma ideia da estabilidade da formulação, entretanto, estudos de estabilidade de curto e longo prazo são necessários para obter dados mais precisos sobre a estabilidade química do fármaco ou sobre os fenômenos de instabilidade física citados anteriormente (BRUXEL et al., 2012).

Diversos são os fatores que podem influenciar na estabilidade das nanoemulsões, podendo estes serem físicos, como temperatura, congelamento e descongelamento e agitação, e químicos, como a presença de eletrólitos, pH e peroxidação lipídica, além da contaminação microbiológica que pode ocorrer devido à presença de água nestas formulações (BRUXEL et al., 2012; KARTHIK; ANANDHARAMAKRISHNAN, 2016; OCA-ÁVALOS; CANDAL; HERRERA, 2017). Neste trabalho, a estabilidade das nanoemulsões foi avaliada após o armazenamento das formulações a temperatura de 25 °C (TA) e 4 °C (GE), através dos parâmetros de tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta e teor de compostos fenólicos totais. As nanoemulsões foram analisadas após 0, 7, 15 e 30 dias de armazenamento e os resultados estão mostrados nas Figuras 17, 18 e 19.

Figura 17 – Resultados obtidos para tamanho de gotícula (a) na avaliação da estabilidade física das nanoemulsões contendo a FAE na temperatura de 25 °C (TA) e 4 °C (GE) após 0, 7, 15 e 30 dias de armazenamento.

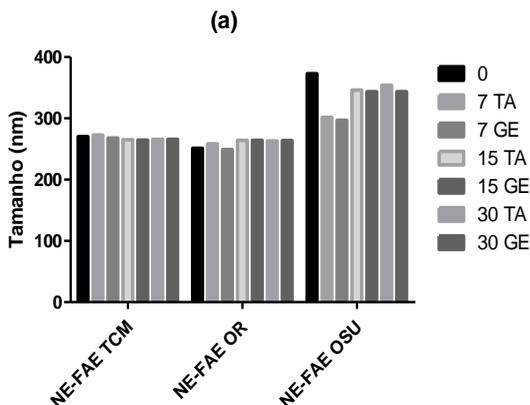


Figura 18 - Resultados obtidos para índice de polidispersão (b) na avaliação da estabilidade física das nanoemulsões contendo a FAE na temperatura de 25 °C (TA) e 4 °C (GE) após 0, 7, 15 e 30 dias de armazenamento.

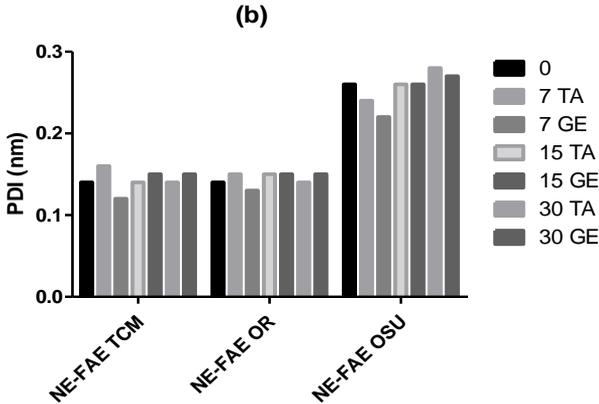
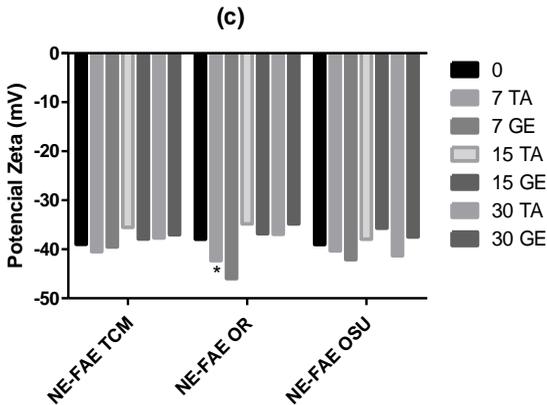


Figura 19 - Resultados obtidos para potencial zeta (c) na avaliação da estabilidade física das nanoemulsões contendo a FAE na temperatura de 25 °C (TA) e 4 °C (GE) após 0, 7, 15 e 30 dias de armazenamento.

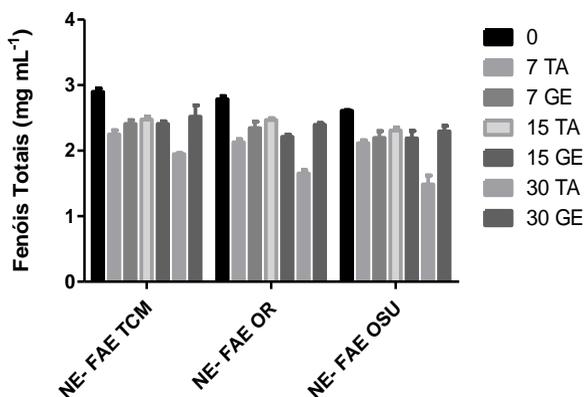


A partir dos resultados foi possível verificar que os parâmetros de tamanho de gotícula e índice de polidispersão não foram alterados significativamente (* $p < 0,05$) após o armazenamento das nanoemulsões contendo a FAE a temperatura de 25 °C e 4 °C, durante o período avaliado (Figura 17 e 18). Quando o potencial zeta foi avaliado, diferença

estatisticamente significativa ($*p < 0,05$) foi encontrado somente para a NE-FAE_{OR}, após 7 dias de armazenamento, em temperatura ambiente (Figura 19).

Quando a estabilidade frente ao teor de compostos fenólicos totais nas nanoemulsões foi avaliada (Figura 20), foi possível verificar a redução no teor destes compostos em ambas as temperaturas, com destaque para o tempo de 30 dias onde foi evidenciado uma menor redução no armazenamento em geladeira com relação à temperatura ambiente.

Figura 20 - Teor de compostos fenólicos totais nas nanoemulsões após 0, 7, 15 e 30 dias de armazenamento a temperatura de 25 °C (TA) e 4 °C (GE).



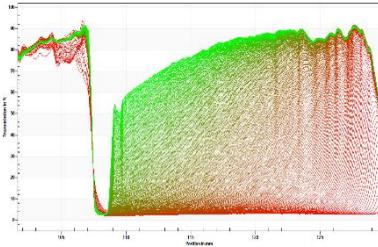
4.5.6.2 Estabilidade acelerada

Estudos de estabilidade acelerada das nanoemulsões brancas e contendo a FAE foram realizados usando uma centrífuga analítica. Nesta técnica, as variações de transmitância ao longo da amostra inserida em cubeta são registradas em função do tempo de centrifugação (Figura 21). A cor vermelha mostrada na Figura 21 corresponde ao perfil de transmitância inicial ao longo da cubeta. Após 2 horas de teste, com leituras a cada 10 segundos, a cor vermelha passa gradualmente para verde. A mudança no perfil de transmitância demonstra o movimento das gotículas ao longo da cubeta, sendo que quanto maior a variação de transmitância, menor a estabilidade da formulação (BERNARDI et al.,

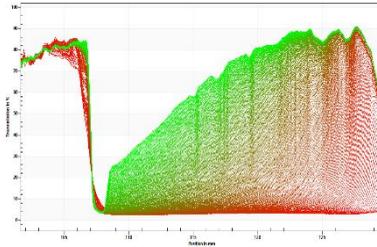
2011; CHEN et al., 2016; CINAR, 2017; OCA-ÁVALOS; CANDAL; HERRERA, 2017).

Figura 21 - Gráficos de transmitância *versus* posição da cubeta por tempo obtidos após centrifugação das nanoemulsões brancas e contendo a FAE.

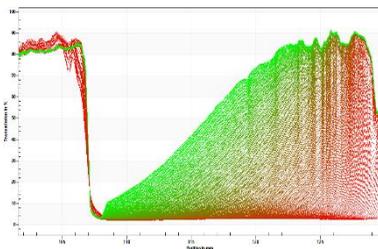
NE_{B7}



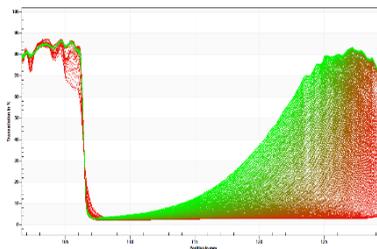
NE-FAE_{MCT}



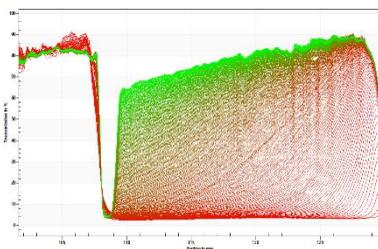
NE_{B11}



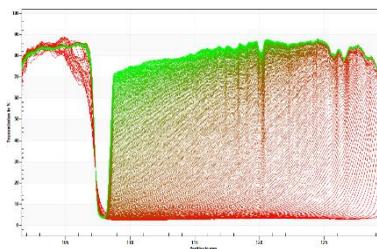
NE-FAE_{OR}



NE_{B15}



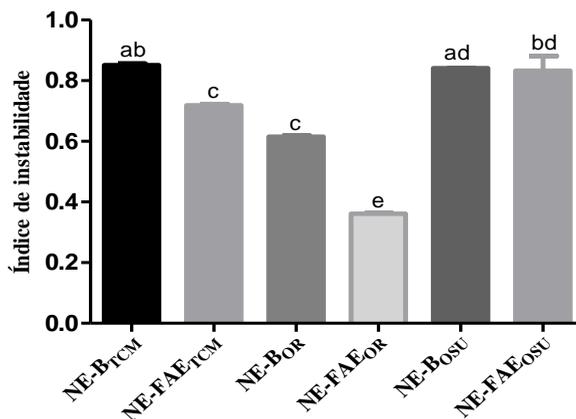
NE-FAE_{OSU}



Outra forma complementar de avaliar a estabilidade dos sistemas através desta técnica é pelo índice de instabilidade (Figura 22), o qual varia de 0 a 1, sendo que quanto mais próximo de 1 mais instável é considerada a formulação. Neste trabalho, as formulações variaram de 0,36 a 0,88, e comparando as formulações brancas e contendo a FAE, é possível verificar que a adição da fração melhorou a estabilidade das

nanoemulsões preparadas com TCM e OR. Para as formulações preparadas com OSU esta diferença não foi observada. É possível verificar ainda que a NE-FAE_{OR} apresentou diferença estatística ($p < 0,05$) significativa de todas as demais formulações e portando, maior estabilidade.

Figura 22 - Índice de instabilidade das nanoemulsões brancas e contendo a FAE. No gráfico, letras diferentes apresentam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).



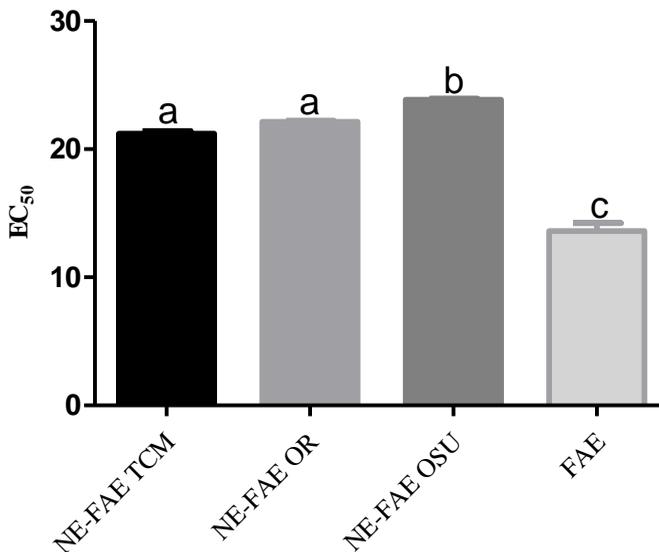
4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS NANOEMULSÕES E FRAÇÃO ACETATO DE ETILA

4.6.1 Método DPPH

Os valores de EC_{50} obtidos após avaliação da atividade antioxidante da FAE e das nanoemulsões contendo a fração são mostrados na Figura 23. Para a FAE, o valor de EC_{50} de $13,62 \pm 1,07 \mu\text{g mL}^{-1}$, inferior aos valores encontrados para as soluções extrativas (Figura 12), o que pode ser relacionado com a maior concentração de compostos fenólicos nesta fração. Por apresentar o valor de EC_{50} mais próximo ao obtido para o ácido gálico ($1,48 \pm 0,03 \mu\text{g mL}^{-1}$), o emprego da FAE mostrou ser promissor, pois permitiu a obtenção de formulações como elevado teor de compostos fenólicos apresentando polaridade adequada para veiculação nas nanoemulsões.

Quando as nanoemulsões foram avaliadas, valores entre 21,20 e 23,86 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de EC_{50} foram encontrados (Figura 23), que foram maiores que o observado para a FAE, porém apresentando ainda boa atividade antioxidante. Curiosamente, a NE-FAE_{OSU} apresentou maior EC_{50} em comparação com a NE-FAE_{TCM} e NE-FAE_{OR}, podendo isso estar relacionado com o método de obtenção desta formulação, que pode ter levado a perda de alguns componentes antioxidantes do óleo no processo de obtenção (CARVALHO, 2014). Outro fator a ser considerado é a relação entre a atividade antioxidante deste óleo e a concentração de vitamina E presente, a qual apresenta grande variação em relação ao tipo de uva e método de extração (PEREIRA, 2008). Assim estudos mais detalhados sobre a composição química e atividade antioxidante dos óleos puros seriam necessários para justificar este resultado.

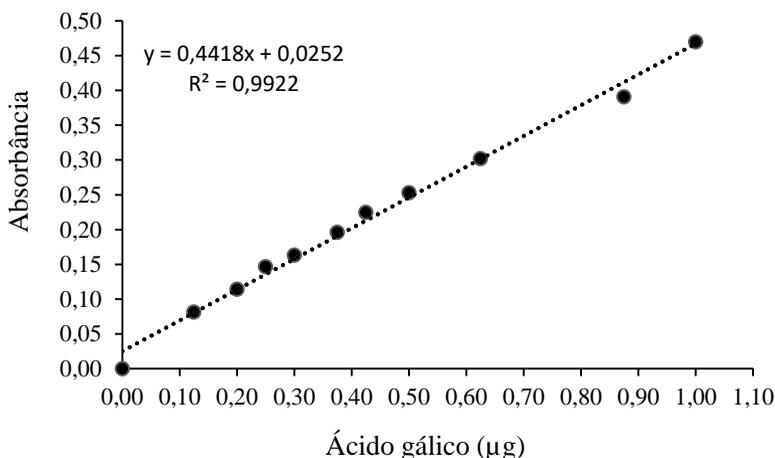
Figura 23 - Atividade antioxidante da FAE e das nanoemulsões contendo a FAE pelo método DPPH. No gráfico, letras diferentes indicam diferença estaticamente significante ($p < 0,05$).



4.6.2 Método FRAP

A FAE e as nanoemulsões contendo a FAE foram igualmente avaliadas quanto ao potencial antioxidante pela determinação do poder de redução do íon ferro (FRAP, *do inglês* Ferric Reducing Antioxidant Power). Este método está baseado na produção do íon Fe^{2+} (forma ferrosa) a partir da redução do íon Fe^{3+} (forma férrica) presente no complexo 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ). Quando a redução ocorre, há uma alteração na tonalidade da mistura de reação, passando de roxo claro a um roxo intenso, cuja absorbância pode ser medida no comprimento de onda de 595 nm (BENZIE; STRAIN, 1996). Para a determinação da atividade antioxidante, uma curva de calibração de ácido gálico foi construída e é mostrada na Figura 24.

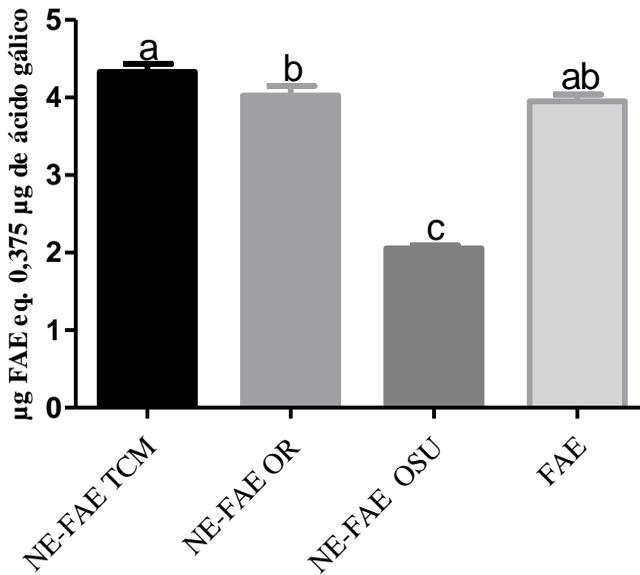
Figura 24 – Curva de calibração do ácido gálico para determinação da atividade antioxidante pelo método FRAP.



A partir da equação da reta obtida na curva padrão de ácido gálico, foi possível estimar a concentração de FE^{+2} (reduzido) presente na solução. Os resultados foram expressos em µg de FAE equivalente a 0,375 µg de ácido gálico (Figura 25). Para a FAE encontrou-se o valor de $3,96 \pm 0,15$ µg desta equivalente a 0,375 µg ácido gálico, enquanto para as formulações os valores foram de $4,33 \pm 0,18$ µg (NE-FAE_{TCM}), $4,03 \pm 0,21$ µg (NE-FAE_{OR}) e $2,06 \pm 0,06$ µg (NE-FAE_{OSU}). Através da análise

estatística, é possível verificar que diferentemente do método DPPH, no método FRAP a NE-FAE_{OSU} apresentou maior potencial antioxidante, ou seja uma menor concentração de FAE encapsulada neste óleo foi suficiente para reduzir o íon ferro na mesma proporção que 0,375 µg de ácido gálico em comparação as demais nanoemulsões (NE-FAE_{TCM} e NE-FAE_{OR})

Figura 25 - Atividade antioxidante das NE-FAE e FAE pelo método FRAP. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$).



Outros autores relataram discrepância entre diferentes técnicas antioxidantes, sendo necessário assim o uso combinado de ensaios para fornecer maiores detalhes sobre o mecanismo antioxidante de extratos na forma livre ou encapsulada (BACCARIN; LEMOS-SENNA, 2014; SESSA et al., 2013).

4.7 AVALIAÇÃO DA PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO* DAS NANOEMULSÕES E DA FAE EM CÉLULAS DE DIFUSÃO DE FRANZ

4.7.1 Solubilidade dos compostos fenólicos totais no meio receptor

A solubilidade dos compostos fenólicos totais no meio receptor foi previamente avaliada a fim de assegurar que os ensaios de permeação cutânea fossem realizados em condições *sink*. Tendo como base o estudo realizado por BACCARIN e LEMOS-SENNA (2014) uma solução de etanol:água (25:75, v/v) foi empregada como meio receptor. A solubilidade da FAE neste meio, expressa como compostos fenólicos totais, foi de $0,7 \text{ mg mL}^{-1}$. Para permitir a quantificação destes compostos nos estudos de permeação cutânea, a concentração utilizada no meio receptor foi de $0,13 \text{ mg mL}^{-1}$, correspondente a $500 \mu\text{L}$ das nanoemulsões ou de uma solução a $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ da FAE. Esses valores equivalem em torno de 18% da concentração na saturação, sendo ainda considerada uma condição *sink*, segundo a literatura (EMA, 2014).

4.7.2 Validação do método analítico de CLAE-DAD

O perfil de permeação e retenção cutânea dos compostos ISO e RES foi avaliado após aplicação da FAE e NE-FAE_{OR} na pele de orelha de porco. Os resultados demonstraram que tais compostos ficaram em grande parte retidos na pele e não chegavam ao compartimento receptor da célula de Franz pois nenhum deles foi detectado no meio receptor. Vale ressaltar que outros picos não identificados foram visualizados no meio receptor, ou seja possivelmente compostos fenólicos com outras características de lipofilicidade são capazes de permear através da pele.

Ainda, em função da baixa intensidade do pico de RES, as quantidades verificadas na pele ficaram abaixo do limite de detecção e quantificação, como também não foi possível quantificar os compostos na técnica de *tape striping*. Assim, unicamente a isoquercitrina foi usada como marcador para a avaliação da quantidade retida na pele. A curva de calibração da isoquercitrina (Figura 26) em uma mistura de água e acetonitrila (2:98, v/v) mostrou ser linear na faixa de concentração de $0,05$ a $4,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($r > 0,999$). Os valores de limite de detecção e de quantificação foram $0,015 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $0,046 \mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente, indicando que o método é suficientemente sensível para quantificação da isoquercitrina na pele.

A especificidade do método analítico foi avaliada após a realização do experimento de permeação empregando, para isto, uma nanoemulsão branca. A análise das amostras da pele após o experimento realizado com a NB₁₁ mostrou que os componentes da formulação e da

pele não interferiram na quantificação da isoquercitrina por CLAE-DAD, no comprimento de onda de 255 nm (Figura 27).

Figura 26 - Curva de calibração de isoquercitrina para o experimento de retenção cutânea.

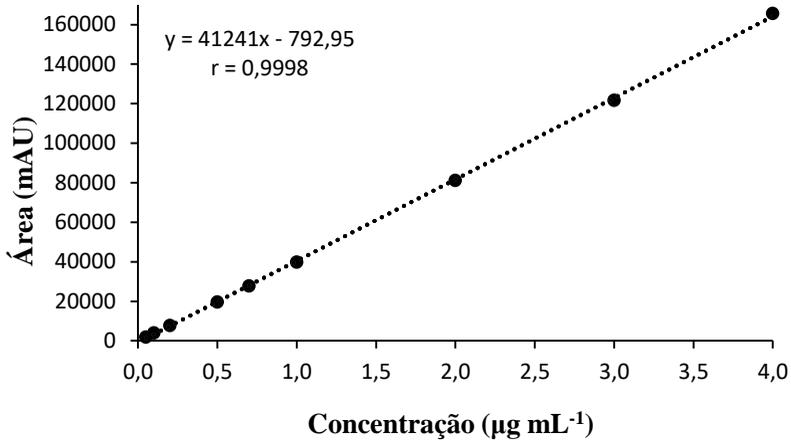
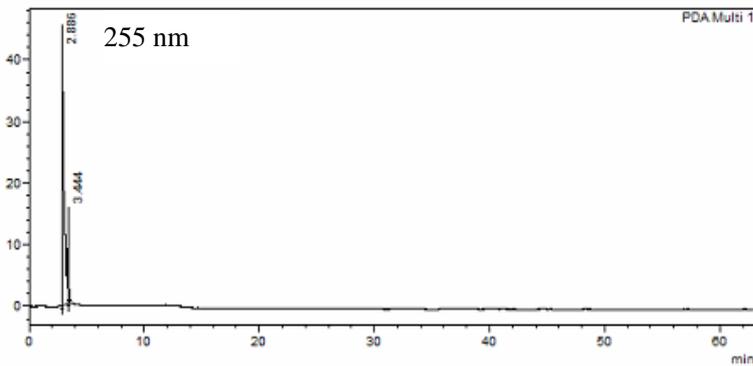


Figura 27 - Cromatograma obtido no experimento de retenção cutânea da nanoemulsão branca.



4.7.3 Estudos de retenção cutânea

Os resultados obtidos na avaliação da retenção cutânea da isoquercitrina, após 8 horas de estudo de permeação estão mostrados na Tabela 16. A análise demonstrou que não houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) na retenção de isoquercitrina livre e encapsulada no excesso e na pele.

Tabela 16 - Retenção cutânea de isoquercitrina após 8 horas de experimento em células de Franz.

	NE-FAE _{OR} ($\mu\text{g cm}^2$)	FAE ($\mu\text{g cm}^2$)
Excesso	$0,91 \pm 0,44^a$	$0,95 \pm 0,13^a$
Pele	$0,65 \pm 0,32^a$	$1,36 \pm 0,55^a$

A isoquercitrina é uma molécula com característica hidrofílica ($\log P$ 0,47) e massa molecular relativamente alta (464,38) o que contribui para uma baixa absorção pois moléculas lipofílicas apresentam maior afinidade pelos componentes da pele (ROTHWELL; DAY; MORGAN, 2005). Entretanto, a capacidade de redução ou eliminação de radicais livres pelos polifenóis está relacionada com a capacidade destes compostos interagirem com a bicamada lipídica, inibindo a peroxidação lipídica (KOŠINOVÁ et al., 2012).

As características anfifílicas dos polifenóis é explicada pela presença dos três anéis aromático (hidrofóbicos) e grupos hidroxila (hidrofílicos), assim a permeação destes compostos ou localização nas camadas da pele é dependente do número e posição dos grupos hidroxila (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; LI et al., 2011).

Um estudo realizado por Kosinová e colaboradores (2012) relata que a quercetina e seus metabólitos permanecem situados logo abaixo da bicamada lipídica, próxima da cabeça polar e sua penetração na pele é dependente das características de carga, polaridade e ligação com hidrogênio. Ainda, em comparação com a quercetina, a ligação da isoquercitrina com glicosídeos mantém o composto próximo da superfície, tornando-o potencial protetor frente ao estresse oxidativo, e como inibidor da peroxidação lipídica.

Assim, sendo desejável que formulações antioxidantes permaneçam na superfície da pele ou permeiem minimamente na epiderme, os resultados de retenção cutânea para isoquercitrina demonstraram que as nanoemulsões podem ser utilizadas de forma segura pois não proporcionaram maior permeação em relação a FAE.

5 CONCLUSÕES

- O método de extração empregado permitiu a obtenção de soluções extrativas a partir do bagaço de uva e a liofilização mostrou-se a técnica de secagem mais adequada para preservação dos compostos fenólicos.
- O fracionamento da SE_{BL} pelo método de partição líquido-líquido com acetato de etila aumentou a concentração de compostos fenólicos e conseqüentemente a atividade antioxidante.
- O método analítico de cromatográfica líquida de alta eficiência acoplado ao detector de arranjo de diodos e espectrofotômetro de massas (CLAE-DAD-ESI-MS/MS) desenvolvido, possibilitou a identificação e quantificação dos compostos fenólicos isoquercitrina e resveratrol na fração acetato de etila do bagaço de uva e nas nanoemulsões contendo esta fração. Esse método foi considerado linear, específico, exato e preciso.
- A técnica de emulsificação espontânea com ou sem agitação ultrassônica mostrou-se eficiente para obtenção das nanoemulsões contendo triglicerídeos de cadeia média, óleo de ricino ou óleo de semente de uva como fase oleosa encapsulando a fração acetato de etila do bagaço de uva.
- A adição da fração acetato de etila nas formulações obtidas com os óleos TCM e OR levou à redução no tamanho das partículas e índice de polidispersão, bem como o aumento da estabilidade frente a fenômenos de separação de fases.
- O estudo de estabilidade de temperatura demonstrou que as formulações permaneceram estáveis quanto ao tamanho e índice de polidispersão após armazenamento a temperatura de 25 °C e 4°C durante 30 dias.
- No estudo de estabilidade acelerada a NE-FAE_{OR} apresentou maior estabilidade frente aos fenômenos de separação de fases.
- As nanoemulsões apresentaram atividade antioxidante significativa pelos métodos avaliados.
- A obtenção de nanoemulsões contendo compostos fenólicos do bagaço da uva mostrou ser viável, visando a atividade antioxidante em produtos cosméticos de uso tópico.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, H.; KAMEL, R.; EL-SAYED, N. Dermal anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-aging effects of Compritol ATO-based Resveratrol colloidal carriers prepared using mixed surfactants. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 541, p. 37–47, 2018.

ABE, L. T. et al. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 394–400, 2007.

ABULMEATY, M. M. A. Sunlight exposure vs. vitamin D supplementation on bone homeostasis of vitamin D deficient rats. **Clinical Nutrition Experimental**, v. 11, p. 1–9, 2017.

ABURJAI, T.; NATSHEH, F. M. Plants used in cosmetics. **Phytotherapy Research**, v. 17, p. 987–1000, 2003.

ADDOR, F. A. S. Antioxidants in dermatology. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 92, p. 356–362, 2017.

AGARWAL, C.; SINGH, R. P.; AGARWAL, R. Grape seed extract induces apoptotic death of human prostate carcinoma DU145 cells via caspases activation accompanied by dissipation of mitochondrial membrane potential and cytochrome c release. **Carcinogenesis**, v. 23, p. 1869–1876, 2002.

AGREGÁN, R. et al. Phenolic compounds from three brown seaweed species using LC-DAD–ESI-MS/MS. **Food Research International**, v. 99, p. 979–985, 1 set. 2017.

AJAZUDDIN; SARAF, S. Applications of novel drug delivery system for herbal formulations. **Fitoterapia**, v. 81, p. 680–689, 2010.

ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, p. 143–152, 2013.

ALAM, M. S. et al. In vivo study of clobetasol propionate loaded nanoemulsion for topical application in psoriasis and atopic dermatitis. **Drug Invention Today**, v. 5, p. 8–12, 2013.

ALBRECHT, S. et al. Quantification and characterization of radical production in human, animal and 3D skin models during sun irradiation measured by EPR spectroscopy. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 131, p. 299–308, 2019.

ALMEIDA, M. E.; TEIXEIRA, H. F.; KOESTER, L. S. Preparação de emulsões submicrométricas: Aspectos teóricos sobre os métodos empregados na atualidade. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, p. 780–788, 2008.

ALVES, A. C. et al. On-line automated evaluation of lipid nanoparticles transdermal permeation using Franz diffusion cell and low-pressure chromatography. **Talanta**, v. 146, p. 369–374, 2016.

ALVES, M. P. et al. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 341, p. 215–220, 2007.

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

ANTONIOLLI, A. et al. Characterization of polyphenols and evaluation of antioxidant capacity in grape pomace of the cv. Malbec. **Food Chemistry**, v. 178, p. 172–178, 2015.

AULTON, M. E.; TAYLOR, K. M. G. The design and manufacture of medicines. **ELSEVIER**, 2013.

BABBAR, N. et al. Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained from six important fruit residues. **Food Research International**, v. 44, p. 391–396, 2011.

BACCARIN, T. et al. Photoprotection by Punica granatum seed oil nanoemulsion entrapping polyphenol-rich ethyl acetate fraction against UVB-induced DNA damage in human keratinocyte (HaCaT) cell line. **Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology**, v. 153, p. 127–136, 2015.

BACCARIN, T.; LEMOS-SENNA, E. Pomegranate Seed Oil Nanoemulsions Encapsulating Pomegranate Peel Polyphenol-Rich Ethyl Acetate Fraction: Development and Antioxidant Assessment. **Journal of Nanopharmaceutics and Drug Delivery**, v. 2, p. 1–11, 2014.

BADR EL-DIN, N. K.; ALI, D. A.; ABOU-EL-MAGD, R. F. Grape seeds and skin induce tumor growth inhibition via G1-phase arrest and apoptosis in mice inoculated with Ehrlich ascites carcinoma. **Nutrition**, v. 58, p. 100–109, 2019.

BANDARA, N.; CHALAMAIAH, M. Bioactives From Agricultural Processing By-products. **Encyclopedia of Food Chemistry**, v. 3, p. 472–480, 2019.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, p. 113–123, 2006.

BAUMANN, L. How to Use Oral and Topical Cosmeceuticals to Prevent and Treat Skin Aging. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, v. 26, p. 407–413, 2018.

BENAYAD, Z.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C.; ES-SAFI, N. E. Identification and quantification of flavonoid glycosides from fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) germinated seeds by LC–DAD–ESI/MS analysis. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 35, p. 21–29, 2014.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70–76, 1996.

BERES, C. et al. Towards integral utilization of grape pomace from

winemaking process: A review. **Waste Management**, v. 68, p. 581–594, 2017.

BERNARDI, D. S. et al. Formation and stability of oil-in-water nanoemulsions containing rice bran oil: in vitro and in vivo assessments. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 44, p. 1–9, 2011.

BOLZINGER, M. A. et al. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 17, p. 156–165, 2012.

BOUCHEMAL, K. et al. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 280, p. 241–251, 2004.

BOURBON, A. I. et al. Characterization of Particle Properties in Nanoemulsions. **Nanoemulsions**, p. 519–546, 2018.

BRAHIM, M.; GAMBIER, F.; BROSSE, N. Optimization of polyphenols extraction from grape residues in water medium. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 18–22, 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopéia Brasileira. 5 ed. Brasília (DF)**, 2010.

BRASIL. **RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 2017.

BREWER, M. S. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, p. 221–247, 2011.

BRUXEL, F. et al. Nanoemulsions As Parenteral Drug Delivery Systems. **Química Nova**, v. 35, p. 1827–1840, 2012.

BURIN, V. M. et al. 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.

CALDAS, T. W. et al. Phenolic compounds recovery from grape skin using conventional and non-conventional extraction methods. **Industrial Crops & Products**, v. 111, p. 86–91, 2018.

CAMPOS, L. M. A. S. et al. Free radical scavenging of grape pomace extracts from Cabernet sauvignon (*Vitis vinifera*). **Bioresource Technology**, v. 99, p. 8413–8420, 2008.

CAROCHO, M.; MORALES, P.; FERREIRA, I. C. F. R. Antioxidants: Reviewing the chemistry, food applications, legislation and role as preservatives. **Trends in Food Science & Technology**, v. 71, p. 107–120, 2018.

CARVALHO, K. V. Desenvolvimento e avaliação de nanoemulsões com extrato etanólico bruto das folhas de *Melaleuca leucadendron* e cloridrato de pilocarpina para uso potencial como radioprotetor tópico. **Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia) -**

Universidade Federal de Ouro Preto, p. 113 p., 2014.

CASTAÑEDA-OVANDO, A. et al. Chemical studies of anthocyanins: A review. **Food Chemistry**, v. 113, p. 859–871, 2009.

CHANDA, S.; DAVE, R. In vitro models for antioxidant activity evaluation and some medicinal plants possessing antioxidant properties : An overview. **African Journal of Microbiology Research**, v. 3, p. 981–996, 2009.

CHEN, H. et al. Investigation into the physical stability of a eugenol nanoemulsion in the presence of a high content of triglyceride. **Royal Society of Chemistry Advanced**, v. 6, p. 91060–91067, 2016.

CHOI, C. W. et al. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. **Plant Science**, v. 163, p. 1161–1168, 2002.

CINAR, K. A review on nanoemulsions : Preparation methods and stability. **Trakya University Journal of Engineering Sciences**, v. 18, p. 73–83, 2017.

COSTA, C. Epidemiologia do câncer de pele no Brasil e evidências sobre sua prevenção. **Diagnóstico e Tratamento**, v. 17, p. 206–208, 2012.

CZAJKOWSKA-KOŚNIK, A.; SZEKALSKA, M.; WINNICKA, K. Nanostructured lipid carriers: A potential use for skin drug delivery systems. **Pharmacological Reports**, v. 71, p. 156–166, 2019.

DAVIDOV-PARDO, G.; MCCLEMENTS, D. J. Nutraceutical delivery systems : Resveratrol encapsulation in grape seed oil nanoemulsions formed by spontaneous emulsification. **Food Chemistry**, v. 167, p. 205–212, 2015.

DENNY, C. et al. Bioprospection of Petit Verdot grape pomace as a source of anti-inflammatory compounds. **Journal of Functional Foods**, v. 8, p. 292–300, 2014.

DEPIERI, L. V. et al. Advances in the bioanalytical study of drug delivery across the skin. **Therapeutic Delivery**, p. 551–594, 2015.

EL MAGHRABY, G. M.; BARRY, B. W.; WILLIAMS, A. C. Liposomes and skin: From drug delivery to model membranes. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 34, p. 203–222, 2008.

EMA. European Medicines Agency. Guideline on quality of transdermal patches. 2014.

ESCOBAR-CHÁVEZ, J. J. et al. The tape-stripping technique as a method for drug quantification in skin. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 11, p. 104–130, 2008.

FERRI, M. et al. White grape pomace extracts, obtained by a sequential enzymatic plus ethanol-based extraction, exert antioxidant, anti-tyrosinase and anti-inflammatory activities. **New Biotechnology**, v. 39, p. 51–58, 2017.

FINNIN, B.; WALTERS, K. A.; FRANZ, T. J. In Vitro Skin

Permeation Methodology. **Transdermal and Topical Drug Delivery: Principles and Practice**, 2012.

FLOR, J.; DAVOLOS, M. R.; CORREA, M. A. Protetores solares. **Química Nova**, v. 30, p. 153–158, 2007.

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.; PEREIRA-FILHO, E. R.; CARRILHO, E. Fingerprinting of anthocyanins from grapes produced in Brazil using HPLC – DAD – MS and exploratory analysis by principal component analysis. **Food Chemistry**, v. 145, p. 395–403, 2014.

GALANAKIS, C. M. Handbook of grape processing by-products. **ELSEVIER**, 2017.

GASPAROTTO JUNIOR, A. et al. Mechanisms underlying the diuretic effects of *Tropaeolum majus* L. extracts and its main component isoquercitrin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, p. 501–509, 2012.

GHARIBZAHEDI, S. M. T.; JAFARI, S. M. Fabrication of Nanoemulsions by Ultrasonication. **ELSEVIER**, p. 233–285, 2018.

GIUSTI, M.; WROLSTAD, R. E. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, 2001.

GOTHAI, S. et al. Pharmacological insights into antioxidants against colorectal cancer: A detailed review of the possible mechanisms. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 107, p. 1514–1522, 2018.

GOULA, A. M.; THYMIATIS, K.; KADERIDES, K. Valorization of grape pomace: Drying behavior and ultrasound extraction of phenolics. **Food and Bioproducts Processing**, v. 100, p. 132–144, 2016.

GOUVINHAS, I. et al. Monitoring the antioxidant and antimicrobial power of grape (*Vitis vinifera* L.) stems phenolics over long-term storage. **Industrial Crops and Products**, v. 126, p. 83–91, 2018.

GOYAL, R. et al. Nanoparticles and nanofibers for topical drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 240, p. 77–92, 2016.

GUARATINI, T.; MEDEIROS, M. H. G.; COLEPICOLO, P. Antioxidantes na manutenção do equilíbrio redox cutâneo: uso e avaliação de sua eficácia. **Química Nova**, v. 30, p. 206–213, 2007.

GÜLÇİN, İ. Antioxidant properties of resveratrol: A structure–activity insight. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, p. 210–218, 2010.

GUPTA, D. Methods for determination of antioxidant capacity: a review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 6, p. 546–566, 2015.

HOLICK, M. F. Photobiology of Vitamin D. **Journal of Clinical and**

Translational Endocrinology, p. 45–55, 2018.

HONARY, S.; ZAHIR, F. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems - A review (Part 1). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, p. 255–264, 2013.

HU, S. et al. Dietary polyphenols as photoprotective agents against UV radiation. **Journal of Functional Foods**, v. 30, p. 108–118, 2017.

HUANG, X. et al. Resveratrol: Review on its discovery, anti-leukemia effects and pharmacokinetics. **Chemico-Biological Interactions**, v. 306, p. 29–38, 2019.

IAL. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. **São Paulo: Instituto Adolfo Lutz**, 2008.

ICH. Validation of analytical procedures: text and methodology. **Harmonised Tripartite Guideline**, 2005.

JENSEN, S. J. K. Oxidative stress and free radicals. **Journal of Molecular Structure**, p. 387–392, 2003.

JEPPS, O. G. et al. Modeling the human skin barrier - Towards a better understanding of dermal absorption. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, p. 152–168, 2013.

KAMMERER, D. et al. Polyphenol Screening of Pomace from Red and White Grape Varieties (*Vitis vinifera* L .) by HPLC-DAD-MS / MS. p. 27–30, 2004.

KARADAG, A.; OZCELIK, B.; SANER, S. Review of methods to determine antioxidant capacities. **Food Analytical Methods**, v. 2, p. 41–60, 2009.

KARTHIK, P.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Enhancing omega-3 fatty acids nanoemulsion stability and in-vitro digestibility through emulsifiers. **Journal of Food Engineering**, v. 187, p. 92–105, 2016.

KASIOTIS, K. M. et al. Resveratrol and related stilbenes: Their anti-aging and anti-angiogenic properties. **Food and Chemical Toxicology**, v. 61, p. 112–120, 2013.

KELEBEK, H. LC-DAD–ESI-MS/MS characterization of phenolic constituents in Turkish black tea: Effect of infusion time and temperature. **Food Chemistry**, v. 204, p. 227–238, 2016.

KHAFAGA, A. F.; NORELDIN, A. E.; TAHA, A. E. The adaptogenic anti-ageing potential of resveratrol against heat stress-mediated liver injury in aged rats: Role of HSP70 and NF- κ B signalling. **Journal of Thermal Biology**, v. 83, p. 8–21, 2019.

KHALIL, C. Human skin explants an in vitro approach for assessing UVB induced damage. **Toxicology in Vitro**, v. 53, p. 193–199, 2018.

KHARADZE, M. et al. Anthocyanins and antioxidant activity of red wines made from endemic grape varieties. **Annals of Agrarian Science**, v. 16, p. 181–184, 2018.

KHAVKIN, J. Aging Skin: Histology, Physiology, and Pathology.

Facial Plastic Surgery Clinics of North America, v. 19, p. 229–234, 2011.

KLANG, V.; VALENTA, C. Lecithin-based nanoemulsions. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 21, p. 55–76, 2011.

KOŠINOVÁ, P. et al. Positioning of antioxidant quercetin and its metabolites in lipid bilayer membranes: Implication for their lipid-peroxidation inhibition. **Journal of Physical Chemistry**, v. 116, p. 1309–1318, 2012.

KUMAR, N.; MANDAL, A. Surfactant Stabilized Oil-in-Water Nanoemulsion: Stability, Interfacial Tension, and Rheology Study for Enhanced Oil Recovery Application. **Energy and Fuels**, v. 32, p. 6452–6466, 2018.

LARSEN, L. R. Influence of fruit juice processing on anthocyanin stability. **Food Research International**, v. 100, p. 354–365, 2017.

LAVELLI, V. et al. Recovery of winemaking by-products for innovative food applications. **Italian Journal of Food Science**, v. 28, p. 542–564, 2016.

LAZZAROTTO, J. J.; TAFFAREL, J. C.; MONTEIRO, R. Caracterização e Análise de Aspectos Sociais, Tecnológicos e Econômico-Financeiros da Viticultura Gaúcha e Catarinense. **Embrapa Uva e Vinho**, 2016.

LEE, E. J. et al. Nanoemulsions improve the efficacy of turmeric in palmitate- and high fat diet-induced cellular and animal models. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 110, p. 181–189, 2019.

LEIFERT, W. R.; ABEYWARDENA, M. Y. Cardioprotective actions of grape polyphenols. **Nutrition Research**, v. 28, p. 729–737, 2008.

LESTER, G. E. et al. Comparative analysis of strawberry total phenolics via Fast Blue BB vs. Folin–Ciocalteu: Assay interference by ascorbic acid. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 27, p. 102–107, 2012.

LEVEQUE, N. et al. Comparison of Franz cells and microdialysis for assessing salicylic acid penetration through human skin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 269, p. 323–328, 2004.

LI, H. et al. Resveratrol attenuates the MSU crystal-induced inflammatory response through the inhibition of TAK1 activity. **International Immunopharmacology**, v. 67, p. 62–68, 2019.

LI, H.; XIA, N.; FÖRSTERMANN, U. Cardiovascular effects and molecular targets of resveratrol. **Nitric Oxide**, v. 26, p. 102–110, 2012.

LI, R. et al. In vivo antioxidative effect of isoquercitrin on cadmium-induced oxidative damage to mouse liver and kidney. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 383, p. 437–445, 2011.

LI, T. et al. Evaluation of anti-leukemia effect of resveratrol by modulating SATA3 signaling. **International Immunopharmacology**, v. 10, p. 18–25, 2010.

LOPES, T. J. et al. Antocianinas: Uma Breve Revisão Das Características Estruturais E Da Estabilidade. **Revista Brasileira Agrocência**, v. 13, p. 291–297, 2007.

LOULI, V.; RAGOUSIS, N.; MAGOULAS, K. Recovery of phenolic antioxidants from wine industry by-products. **Bioresource Technology**, v. 92, p. 201–208, 2004.

LOVELYN, C.; ATTAMA, A. A. Current State of Nanoemulsions in Drug Delivery. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 2, p. 626–639, 2011.

LUCERO, M. J. et al. Drug diffusion from disperse systems with a hydrophobically modified polysaccharide: Enhancer® vs Franz cells. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 149–156, 2013.

LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chemico-Biological Interactions**, v. 224, p. 164–175, 2014.

MARTÍN, A. R. et al. The effects of resveratrol, a phytoalexin derived from red wines, on chronic inflammation induced in an experimentally induced colitis model. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, p. 873–885, 2006.

MATA, A. et al. Contribution to the characterization of *Opuntia* spp. juices by LC–DAD–ESI–MS/MS. **Food Chemistry**, v. 210, p. 558–565, 2016.

MATHES, S. H.; RUFFNER, H.; GRAF-HAUSNER, U. The use of skin models in drug development. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 69–70, p. 81–102, 2014.

MCCLEMENTS, D. J. Nanoemulsions versus microemulsions: Terminology, differences, and similarities. **Soft Matter**, v. 8, p. 1719–1729, 2012.

MCCLEMENTS, D. J.; JAFARI, S. M. General Aspects of Nanoemulsions and Their Formulation. **Nanoemulsions - Elsevier**, p. 3–20, 2018.

MCCLEMENTS, D. J.; RAO, J. Food-Grade Nanoemulsions: Formulation, Fabrication, Properties, Performance, Biological Fate, and Potential Toxicity. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, p. 285–330, 2011.

MEDINA, M. B. Simple and rapid method for the analysis of phenolic compounds in beverages and grains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 1565–1571, 2011a.

MEDINA, M. B. Determination of the total phenolics in juices and superfruits by a novel chemical method. **Journal of Functional Foods**, v. 3, p. 79–87, 2011b.

MELLO, L. M. R. DE. Vitivinicultura brasileira: panorama 2016. **Embrapa Uva e Vinho**, p. 1–7, 2017.

MELO, P. S. **Composição química e atividade biológica de resíduos agroindustriais**. [s.l.] Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2010.

MELO, P. S. et al. Composição fenólica e atividade antioxidante de resíduos agroindustriais. **Ciência Rural**, v. 41, p. 1088–1093, 2011.

MENG, Q. et al. Improved absorption of β -carotene by encapsulation in an oil-in-water nanoemulsion containing tea polyphenols in the aqueous phase. **Food Research International**, v. 116, p. 731–736, 2019.

MENON, G. K. New insights into skin structure: Scratching the surface. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. S3–S17, 2002.

MIASTKOWSKA, M. et al. The kinetic study of isotretinoin release from nanoemulsion. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 510, p. 63–68, 2016.

MIROŃCZUK-CHODAKOWSKA, I.; WITKOWSKA, A. M.; ZUJKO, M. E. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. **Advances in Medical Sciences**, v. 63, n. 1, p. 68–78, 1 mar. 2018.

MONTENEGRO, L. et al. From nanoemulsions to nanostructured lipid carriers: A relevant development in dermal delivery of drugs and cosmetics. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 32, p. 100–112, 2016.

MOURE, A. et al. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, v. 72, p. 145–171, 2001.

NAYAK, A. et al. Valorisation potential of Cabernet grape pomace for the recovery of polyphenols: Process intensification, optimisation and study of kinetics. **Food and Bioproducts Processing**, v. 109, p. 74–85, 2018.

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

NICHOLS, J. A.; KATIYAR, S. K. Skin photoprotection by natural polyphenols: Anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. **Archives of Dermatological Research**, v. 302, p. 71–83, 2010.

NILES, R. M. et al. Resveratrol is a potent inducer of apoptosis in human melanoma cells. **Cancer Letters**, v. 190, p. 157–163, 2003.

NISKA, K. et al. Metal nanoparticles in dermatology and cosmetology: Interactions with human skin cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 295, p. 38–51, 2018.

NUNES, M. A. et al. Cardioprotective properties of grape seed proanthocyanidins: An update. **Trends in Food Science & Technology**, v. 57, p. 31–39, 2016.

OCA-ÁVALOS, J. M. M.; CANDAL, R. J.; HERRERA, M. L. Nanoemulsions: stability and physical properties. **Current Opinion in Food Science**, v. 16, p. 1–6, 2017.

OKIYAMA, D. C. G.; NAVARRO, S. L. B.; RODRIGUES, C. E. C.

Cocoa shell and its compounds: Applications in the food industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 63, p. 103–112, 2017.

OLIVEIRA, A. C. DE et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, p. 689–702, 2009.

OLIVEIRA, G. L. . Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH •: estudo de revisão. v. 17, p. 36–44, 2015.

OYENIHI, A. B.; SMITH, C. Are polyphenol antioxidants at the root of medicinal plant anti-cancer success? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 229, p. 54–72, 2019.

PAILLER-MATTEI, C. et al. Interpretation of the human skin biotribological behaviour after tape stripping. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 8, p. 934–941, 2011.

PANIĆ, M. et al. Ready-to-use green polyphenolic extracts from food by-products. **Food Chemistry**, v. 283, p. 628–636, 2019.

PATHAK, K.; PATTNAIK, S.; SWAIN, K. Application of Nanoemulsions in Drug Delivery. **Nanoemulsions - Elsevier**, p. 415–433, 2018.

PEDROZA, M. A. et al. Microwave-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Dried Waste Grape Skins. **International Journal of Food Engineering**, v. 11, p. 359–370, 2015.

PENUMATHSA, S. V. et al. Statin and resveratrol in combination induces cardioprotection against myocardial infarction in hypercholesterolemic rat. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 42, p. 508–516, 2007.

PEREIRA, G. G. Obtenção de nanoemulsões O/A à base de óleo de semente de uva e oliva aditivadas de metoxicinamato de octila e estudo do potencial antioxidante e fotoprotetor das emulsões. **Universidade de São Paulo**, 2008.

PERESTRELO, R. et al. Phenolic profile of Sercial and Tinta Negra Vitis vinifera L. grape skins by HPLC-DAD-ESI-MS: Novel phenolic compounds in Vitis vinifera L. grape. **Food Chemistry**, v. 135, p. 94–104, 2012.

PERRON, N. R.; BRUMAGHIM, J. L. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. **Cell Biochemistry and Biophys**, v. 53, p. 75–100, 2009.

PINTAC, D. et al. Solvent selection for efficient extraction of bioactive compounds from grape pomace. **Industrial Crops & Products**, v. 111, p. 379–390, 2018.

PISOSCHI, A. M.; NEGULESCU, G. P. Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. **Biochemistry & Analytical Biochemistry**, v. 01, n. 01, p. 1–10, 2012.

PRADAL, D. et al. Integrated extraction-adsorption process for

selective recovery of antioxidant phenolics from food industry by-product. **Chemical Engineering & Processing : Process Intensification**, v. 127, p. 83–92, 2018.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4290–4302, 2005.

RABELO, C. A. S. et al. Formulation and characterization of water-in-oil nanoemulsions loaded with açai berry anthocyanins: Insights of degradation kinetics and stability evaluation of anthocyanins and nanoemulsions. **Food Research International**, v. 106, p. 542–548, 2018.

RAI, V. K. et al. Nanoemulsion as pharmaceutical carrier for dermal and transdermal drug delivery: Formulation development, stability issues, basic considerations and applications. **Journal of Controlled Release**, v. 270, p. 203–225, 2018.

RAJAURIA, G.; FOLEY, B.; ABU-GHANNAM, N. Identification and characterization of phenolic antioxidant compounds from brown Irish seaweed *Himantalia elongata* using LC-DAD–ESI-MS/MS. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 37, p. 261–268, 2016.

RASCÓN, D. S.; FERREIRA, A. D.; SILVA, M. G. Cumulative and momentary skin exposures to solar radiation in central receiver solar systems. **Energy**, v. 137, p. 336–349, 2017.

RATZ-LYKO, A. et al. Influence of polyphenols on the physiological processes in the skin. **Phytotherapy Research**, v. 29, p. 509–517, 2015.

ROBERTS, M. et al. Topical and cutaneous delivery using nanosystems. **Journal of Controlled Release**, v. 247, p. 86–105, 2017.

ROCKENBACH, I. I. et al. Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades Tannat e Ancelota. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 238–244, 2008.

ROCKENBACH, I. I. Compostos fenólicos, ácidos graxos e capacidade antioxidante do bagaço da vinificação de uvas tintas (*Vitis vinifera* e *Vitis labrusca*). 2008.

ROCKENBACH, I. I. et al. Characterization of flavan-3-ols in seeds of grape pomace by CE, HPLC-DAD-MSn and LC-ESI-FTICR-MS. **Food Research International**, v. 48, p. 848–855, 2012.

RODRIGUES, F. et al. Permeation of topically applied caffeine from a food by-product in cosmetic formulations: Is nanoscale in vitro approach an option? **International Journal of Pharmaceutics**, v. 513, p. 496–503, 2016.

RODRIGUES, F.; PIMENTEL, F. B.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Olive by-products: Challenge application in cosmetic industry. **Industrial Crops and Products**, v. 70, p. 116–124, 2015.

ROGERIO, A. P. et al. Anti-inflammatory activity of quercetin and isoquercitrin in experimental murine allergic asthma. **Inflammation Research**, v. 56, p. 402–408, 2007.

ROSTAMI, H. et al. Development of cumin essential oil nanoemulsions and its emulsion filled hydrogels. **Food Bioscience**, v. 26, p. 126–132, 2018.

ROTHWELL, J. A.; DAY, A. J.; MORGAN, M. R. A. Experimental determination of octanol-water partition coefficients of quercetin and related flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4355–4360, 2005.

RUBERTO, G. et al. Polyphenol constituents and antioxidant activity of grape pomace extracts from five Sicilian red grape cultivars. **Food Chemistry**, v. 100, p. 203–210, 2007.

SAJJADI, S.; JAHANZAD, F.; BROOKS, B. W. Phase inversion in abnormal O/W/O emulsions: I. Effect of surfactant concentration. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 41, p. 6033–6041, 2002.

SAKAKI, J. et al. Polyphenol-Rich Diets in Cardiovascular Disease Prevention. **Analysis in Nutrition Research - Elsevier**, p. 259–298, 2019.

SALIM, N. et al. Formation of Nanoemulsion Containing Ibuprofen by PIC Method for Topical Delivery. **Materials Today: Proceedings**, v. 5, p. S172–S179, 2018.

SCHUH, R. S.; BRUXEL, F.; TEIXEIRA, H. F. Physicochemical properties of lecithin-based nanoemulsions obtained by spontaneous emulsification or high-pressure homogenization. **Quimica Nova**, v. 37, p. 1193–1198, 2014.

SESSA, M. et al. Exploitation of Polyphenolic Extracts from Grape Marc as Natural Antioxidants by Encapsulation in Lipid-Based Nanodelivery Systems. **Food Bioprocess Technology**, v. 6, p. 2609–2620, 2013.

SHAH, P.; BHALODIA, D.; SHELAT, P. Nanoemulsion: A pharmaceutical review. **Systematic Reviews in Pharmacy**, v. 1, p. 24–32, 2010.

SILVA, C. G. et al. In vitro and in vivo determination of antioxidant activity and mode of action of isoquercitrin and Hyptis fasciculata. **Phytomedicine**, v. 16, p. 761–767, 2009.

SINGH, P.; KESHARWANI, R. K.; KESERVANI, R. K. Antioxidants and Vitamins: Roles in Cellular Function and Metabolism. Roles in Cellular Function and Metabolism. **Sustained Energy for Enhanced Human Functions and Activity - Elsevier**, p. 385–407, 2017.

SINGH, Y. et al. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 252, p. 28–49, 2017.

SOARES, M. et al. Permeação cutânea: Desafios e oportunidades. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 36, n. 3, p. 337–

348, 2015.

SORIANO-RUIZ, J. L. et al. Biopharmaceutical profile of a clotrimazole nanoemulsion: Evaluation on skin and mucosae as anticandidal agent. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 554, p. 105–115, 2019.

SOSA, L. et al. Amphotericin B releasing topical nanoemulsion for the treatment of candidiasis and aspergillosis. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 13, p. 2303–2312, 2017.

SOTO, M.; FALQUÉ, E.; DOMÍNGUEZ, H. Relevance of Natural Phenolics from Grape and Derivative Products in the Formulation of Cosmetics. **Cosmetics**, p. 259–276, 2015.

SPIGNO, G. et al. Nanoencapsulation systems to improve solubility and antioxidant efficiency of a grape marc extract into hazelnut paste. **Journal of Food Engineering**, v. 114, p. 207–214, 2013.

SPIGNO, G.; DE FAVERI, D. M. 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.

SZE, A. et al. Zeta-potential measurement using the Smoluchowski equation and the slope of the current–time relationship in electroosmotic flow. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 261, p. 402–410, 2003.

TAARJI, N. et al. Formulation and stabilization of oil-in-water nanoemulsions using a saponins-rich extract from argan oil press-cake. **Food Chemistry**, v. 246, p. 457–463, 2018.

TEIXEIRA, L. N.; STRINGHETA, P. C.; OLIVEIRA, F. A. DE. Comparação de métodos para quantificação de antocianinas. **Revista Ceres**, v. 55, p. 297–304, 2008.

TEO, S. Y. et al. In Vitro Evaluation of Novel Phenytoin-Loaded Alkyd Nanoemulsions Designed for Application in Topical Wound Healing. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 106, p. 377–384, 2017.

TOBIN, D. J. Introduction to skin aging. **Journal of Tissue Viability**, v. 26, p. 37–46, 2017.

TOMAZ, I. et al. Extraction Methods of Polyphenol From Grapes : Extractions of Grape Polyphenols. **Polyphenols in Plants - Elsevier**, p. 151–167, 2019.

TOMIC, J. et al. Resveratrol has anti-leukemic activity associated with decreased O-GlcNAcylated proteins. **Experimental Hematology**, v. 41, p. 675–686, 2013.

TORRES, C. DE et al. Freeze-dried grape skins by-products to enhance the quality of white wines from neutral grape varieties. **Food Research International**, v. 69, p. 97–105, 2015.

TSAI, Y.-F. et al. Role of Akt-Dependent Pathway in Resveratrol-Mediated Cardioprotection after Trauma-Hemorrhage. **Journal of Surgical Research**, v. 176, p. 171–177, 2012.

TSAO, R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. **Nutrients**, v. 2, p. 1231–1246, 2010.

VALENTOVÁ, K. et al. Isoquercitrin: Pharmacology, toxicology, and metabolism. **Food and Chemical Toxicology**, v. 68, p. 267–282, 2014.

VOGT, A. et al. Nanocarriers for drug delivery into and through the skin — Do existing technologies match clinical challenges? **Journal of Controlled Release**, v. 242, p. 3–15, 2016.

WIDEL, M. et al. Induction of bystander effects by UVA, UVB, and UVC radiation in human fibroblasts and the implication of reactive oxygen species. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 68, p. 278–287, 2014.

XI, J. et al. Mechanism for resveratrol-induced cardioprotection against reperfusion injury involves glycogen synthase kinase 3 β and mitochondrial permeability transition pore. **European Journal of Pharmacology**, v. 604, p. 111–116, 2009.

XIA, Q. et al. Mechanisms of nanotoxicity: Generation of reactive oxygen species. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 22, p. 64–75, 2014.

XIE, W. et al. Hepatoprotective effect of isoquercitrin against acetaminophen-induced liver injury. **Life Sciences**, v. 152, p. 180–189, 2016.

YOTSUMOTO, K. et al. Improvement of the skin penetration of hydrophobic drugs by polymeric micelles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 553, p. 132–140, 2018.

YOUNG, A. R.; CLAVEAU, J.; ROSSI, A. B. Ultraviolet radiation and the skin: Photobiology and sunscreen photoprotection. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 76, p. 100–109, 2017.

YUN, J. et al. Fungicidal effect of isoquercitrin via inducing membrane disturbance. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1848, p. 695–701, 2015.

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

ZHANG, Y. et al. DJ-1 preserving mitochondrial complex I activity plays a critical role in resveratrol-mediated cardioprotection against hypoxia/reoxygenation-induced oxidative stress. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 98, p. 545–552, 2018.

ZHAO, C.-L. et al. Stability-increasing effects of anthocyanin glycosyl acylation. **Food Chemistry**, v. 214, p. 119–128, 2017.

ZHOU, K.; RAFFOUL, J. J. Potential anticancer properties of grape antioxidants. **Journal of Oncology**, p. 1–8, 2012.

ŻUKOWSKI, P.; MACIEJCZYK, M.; WASZKIEL, D. Sources of free radicals and oxidative stress in the oral cavity. **Archives of Oral Biology**, v. 92, p. 8–17, 2018.