

Valorização dos subprodutos obtidos a partir do processamento de vinho – bagaço de uva, para promover a sustentabilidade do setor industrial

Karoline Griebler Ribeiro

Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar no âmbito da dupla diplomação com a Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Orientado por:
Doutora Eliana Pereira
Doutora Lillian Barros
Professora Doutora Fernanda Vitória Leimann

Bragança
2023

“Apenas tente algo novo. Não tenha medo. Saia de sua zona de conforto e voe.”

Michelle Obama

Este trabalho foi financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER) através do Programa Operacional Regional Norte 2020, no âmbito do projeto Copromoção I&D Bio4Drinks: Obtenção de Ingredientes Naturais Multifuncionais para a Indústria de Bebidas (NORTE-01-0247-FEDER- 113508).



Agradecimentos

Dedico esta tese a todas as pessoas que estiveram comigo nesses últimos anos e os quais me proporcionaram estar aqui hoje, como forma de agradecimento sincero pelo papel fundamental que desempenharam na minha formação acadêmica e pessoal.

Quero agradecer a toda minha família em especial a minha mãe, Glaci, por todo esforço, ajuda e compreensão. A minha irmã Janaína e o meu padrasto Paulo por todo apoio.

Quero agradecer à Doutora Eliana Pereira do Instituto Politécnico de Bragança por toda a dedicação, paciência e ensinamentos repassados durante o desenvolvimento do projeto.

À Doutora Lillian Barros do Instituto Politécnico de Bragança por toda a contribuição e auxílio prestado.

À Doutora Fernanda Vitória Leimann da Universidade Tecnológica Federal do Paraná pelos esclarecimentos e colaboração.

Quero agradecer a todos os meus amigos e colegas que estiveram comigo durante graduação e agora na dupla diplomação. Guardarei com muito carinho todos os momentos vividos, obrigada por tornarem mais agradáveis e descontraídas as muitas horas de estudo e de laboratório, por todo o apoio e incentivo. Principalmente aqui em Bragança, foram minha família.

Agradeço à Universidade Tecnológica Federal do Paraná e ao Instituto Politécnico de Bragança e a todos os professores, em especial a professora Ana Paula Perón, e funcionários ligados aos mesmos por me proporcionarem esta experiência única da dupla diplomação. Em especial, à Tatiane Oliveira, Eleomar de Oliveira Pires Júnior e Filipa Fernandes por todo auxílio prestado em laboratório para o desenvolvimento desse estudo.

Abreviaturas

AAPH	2,2'-Azobis (2-metilpropionamida) di-hidroclorido
AGS	Adenocarcinoma gástrico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
b.s	Base seca
CAA	“Atividade antioxidante celular”
CaCo	Adenocarcinoma colorretal
CMB	Concentração mínima bactericida
CMF	Concentração mínima fungicida
CMI	Concentração mínima inibitória
DAD	Detetor de díodos
DCFH	2,7-diclorodihidrofluoresceína
DMEM	Meio de cultura Dulbecco Modified Eagle
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EAM	Extração assistida por micro-ondas
EAU	Extração assistida por ultrassons
ECACC	<i>European Collection of Animal Cell Culture</i>
EM	Extração por maceração
ESI	Ionização por electrospray
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura
FeSO ₄	Sulfato de ferro
GAE	“Equivalente de ácido gálico”
GI ₅₀	Concentração que inibe 50% do crescimento celular
HBSS	Solução salina equilibrada de Hank
HMF	Hidroximetilfurfural
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HPLC-DAD-ESI/MS	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de arranjo de díodos e a um espectrómetro de massa com uma fonte de ionização de electrospray

INT	Cloreto de <i>p</i> -iodonitrotetrazólio
kV	Quilovolt
LC	“Cromatografia Líquida”
LPS	Lipopolissacarídeos
LTQ XL	Espectrômetro de massa Linear Íon Trap
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
MA	Ágar malte
MCF-7	Carcinoma da mama
MDA	Malodialdeído
MHB	“Ágar Mueller-Hinton”
MS	Espectrometria de massa
NCI-H460	Carcinoma do pulmão
NCTC	<i>National Collection of Type Cultures</i>
NED	Hidrocloreto de N-(1-naftil) etilenodiamina
NO	Óxido nítrico
<i>p/v</i>	Peso/volume
pH	Potencial hidrogeniônico
PIB	Produto interno bruto
RAW 264.7	Macrófago de monócitos de camundongo
<i>rpm</i>	Rotações por minuto
RPMI	Meio de cultura Roswell Park Memorial Institute
RPMI-1640	Meio Roswell Park Memorial Institute
SFB	Soro Fetal Bovino
SRB	Sulforrodamina B
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Inibição da formação de substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
TSB	Caldo tríptico de soja
UFC	Unidade formadora de colônia
UPLC	Cromatografia líquida de ultra-eficiência

UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná
UV-Vis	Radiação ultravioleta-visível
v/v	Volume/volume

Índice

Índice de Figuras	ix
Índice de Tabelas	x
Índice de Equações	xi
Resumo	xii
Abstract	xiv
1 Introdução	1
1.1 Sustentabilidade no setor agroindustrial.....	1
1.2 Bioresíduos gerados no setor agroindustrial.....	2
1.3 Compostos bioativos presentes nos bioresíduos.....	4
1.3.1 O caso particular dos compostos fenólicos	6
1.4 Técnicas de extração.....	8
1.5 Subprodutos alimentares: medidas estratégicas para a criação de soluções industriais sustentáveis	10
1.6 Caracterização, origem e produção da uva.....	10
1.6.1 Bagaço de uva	11
1.6.2 Composição nutricional e química.....	12
1.6.3 Aplicações industriais e benefícios	13
2 Objetivos.....	15
3 Material e métodos	17
3.1 Amostras em estudo: aquisição e processamento	17
3.2 Padrões e reagentes	17
3.2.1 Análise química: determinação do perfil fenólico individual.....	17
3.2.2 Estudos das bioatividades	17
3.3 Extração dos compostos fenólicos através da aplicação de três metodologias distintas.....	18
3.3.1 Extração por maceração	18
3.3.2 Extração assistida por ultrassons.....	19
3.3.3 Extração assistida por micro-ondas.....	20
3.4 Determinação do perfil fenólico individual das amostras do bagaço de uva: análise cromatográfica	21

3.5 Avaliação das propriedades bioativas dos extratos obtidos a partir do bagaço de uva.....	22
3.5.1 Preparação dos extratos.....	22
3.5.2 Atividade antioxidante.....	23
3.5.2.1 Inibição da peroxidação lipídica em tecidos cerebrais de porco através da formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico TBARS.....	23
3.5.2.2 Avaliação da atividade antioxidante celular (CAA).....	24
3.5.3 Atividade antimicrobiana.....	25
3.5.3.1 Atividade antibacteriana.....	25
3.5.3.2 Atividade antifúngica.....	26
3.5.4 Avaliação da citotoxicidade e hepatotóxica.....	27
3.5.5 Avaliação da atividade anti-inflamatória.....	28
3.6 Incorporação do extrato mais promissor, obtidos a partir de bagaço de uva num produto alimentar.....	29
3.6.1.1 Preparação dos <i>Wraps</i>	29
3.6.2 Determinação da carga microbiana do produto alimentar.....	30
3.6.2.1 Preparação do meio de cultura.....	30
3.6.2.2 Preparação das amostras para a análise da carga microbiana.....	31
3.6.3 Análise estatística.....	32
4 Resultados e discussão.....	33
4.1 Compostos fenólicos presentes no bagaço de uva.....	33
4.2 Avaliação das propriedades bioativas dos extratos hidroetanólicos obtidos a partir do bagaço de uva.....	37
4.2.1 Atividade antioxidante.....	37
4.2.2 Atividade antimicrobiana.....	40
4.2.3 Avaliação da citotoxicidade e hepatotóxica.....	44
4.3 Estudo de incorporação do extrato rico em compostos fenólicos, obtidos a partir do bagaço de uva em <i>wraps</i>.....	46
4.3.1 Avaliação da carga microbiana.....	46
5 Considerações finais.....	50
6 Referências bibliográficas.....	51

Índice de Figuras

Figura 1: Produção global de frutas no período 2010 – 2020	3
Figura 2: As principais classes de compostos bioativos.....	5
Figura 3: Representação esquemática dos objetivos da dissertação.....	16
Figura 4: (A) Amostra do bagaço de uva desidratada; (B) Amostra do bagaço de uva triturada.....	17
Figura 5: Etapas da extração por maceração do bagaço de uva.	19
Figura 6: Etapas da extração assistida por ultrassons do bagaço de uva.....	20
Figura 7: Etapas da extração assistida por micro-ondas do bagaço de uva.....	21
Figura 8: Ensaio de avaliação da atividade antioxidante: TBARS.	24
Figura 9: Etapas de preparação dos <i>wraps</i>	30
Figura 10: Preparação das amostras para a análise da carga microbiana.	32
Figura 11: Gráficos do crescimento microbiano.	48

Índice de Tabelas

Tabela 1: Principais compostos fenólicos em diferentes frações da uva..... 13

Tabela 2: Compostos fenólicos encontrados no bagaço de uva, obtidos por diferentes métodos de extração 36

Tabela 3: Atividade antioxidante dos extratos hidroetanólicos obtidos a partir do bagaço de uva em diferentes métodos de extração 38

Tabela 4: Atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos hidroetanólicos obtidos a partir do bagaço de uva em diferentes métodos de extração 41

Tabela 5: Atividade citotóxica e anti-inflamatória dos extratos hidroetanólicos obtidos a partir do bagaço de uva em diferentes métodos de extração 45

Índice de Equações

Equação 1. Equação da determinação da taxa de inibição em ensaio TBARS 24

Resumo

O setor agroalimentar está em constante reformulação e inovação, no que concerne ao seu processo produtivo e ao destino dos resíduos que dele advêm.

Durante algumas décadas este setor focava-se unicamente na produção e processamento de alimentos, não havendo preocupação relativamente à gestão dos resíduos gerados. No entanto, considerando toda a problemática em torno deste tema, a indústria tem vindo a promover o reaproveitamento dos bioresíduos que se obtêm ao longo de toda a cadeia produtiva e de comercialização, tornando-se mais sustentável.

Os resíduos do setor agroindustrial, principalmente os de origem vegetal (frutas e legumes), apresentam na sua composição uma concentração significativa de compostos bioativos, com ação biológica, nomeadamente antioxidante, antimicrobiana, antidiabética, hepatoprotetora, entre outras. O caso particular da indústria vitivinícola, apresenta quantidades significativas de subprodutos, ricos em compostos de elevado interesse, especialmente ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, estilbenos. Contudo, aquando do seu reaproveitamento para obtenção destes compostos, é necessário estabelecer qual o processo de extração mais rentável.

Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo avaliar os compostos fenólicos presentes nos resíduos gerados a partir da produção do vinho, ou seja, do bagaço de uva (sementes, talos, cascas), através da aplicação de diferentes técnicas de extração, como sendo a extração por maceração (EM), extração assistida por ultrassons (EAU) e extração assistida por micro-ondas (EAM). O perfil individual de compostos fenólicos foi determinado por HPLC-DAD-ESI/MS e o potencial bioativo foi avaliado através das atividades antioxidante, antimicrobiana, citotóxica e anti-inflamatória; e foi também testada a toxicidade dos extratos obtidos. Por fim, o extrato que demonstrou maior ação bioativa foi incorporado em *wraps* (produto de panificação) e o seu desempenho como conservante foi testado através da avaliação da carga microbiana ao longo do tempo de prateleira.

Nas amostras obtidas a partir do bagaço de uva foram identificados ácidos fenólicos, taninos, flavonoides e estilbenos. A EM evidenciou um maior número de compostos (19 compostos), assim como a maior concentração dos mesmos, sendo um pentâmero de procianidina o composto mais abundante.

Em relação à ação biológica testada, os extratos apresentaram potencial antifúngico e capacidade antibacteriana satisfatória frente às estipes estudadas. Em relação à capacidade antiproliferativa, os extratos obtidos através da EM e EAU apresentaram os melhores resultados em células tumorais. E os extratos obtidos da EAM e EM não apresentaram toxicidade nem atividade anti-inflamatória.

Considerando os resultados com a maior concentração de compostos fenólicos e a melhor ação bioativa dos ensaios realizados, o extrato obtido por maceração foi incorporado em *wraps*. Três formulações foram desenvolvidas: controle (sem adição de aditivos), com adição do extrato (ingrediente natural) e com adição do conservante sintético (sorbato de potássio — E202), e avaliada a carga microbiana de mesófilos aeróbios totais, coliformes, bolores e leveduras durante um período de armazenamento (0, 3 e 7 dias). Os resultados revelaram uma redução do crescimento de mesófilos totais até ao terceiro dia de armazenamento comparativamente com a amostra controle.

Este estudo demonstrou a importância e inovação da utilização sustentável dos resíduos agroindustriais, como o bagaço de uva, para a obtenção de compostos fenólicos bioativos e o seu potencial como conservantes naturais, contribuindo para a sustentabilidade e avanço do setor agroalimentar.

Palavras Chaves: Bagaço de uva, compostos fenólicos, extração, reaproveitamento.

Abstract

The agri-food sector is constantly undergoing reformulation and innovation regarding its production process and the disposal of resulting waste. For several decades, this sector focused solely on food production and processing, without concern for waste management. However, considering the issues surrounding this topic, the industry has been promoting the reuse of bio-waste generated throughout the entire production and marketing chain, making it more sustainable.

Waste from the agro-industrial sector, especially of plant origin (fruits and vegetables), contains a significant concentration of bioactive compounds in its composition, including antioxidant, antimicrobial, antidiabetic, hepatoprotective, and other biological activities. In the particular case of the winemaking industry, there are significant quantities of byproducts rich in compounds of high interest, especially phenolic acids, flavonoids, tannins, and stilbenes. However, when reusing these byproducts to obtain these compounds, it is necessary to establish the most cost-effective extraction process.

In this sense, the present study aimed to evaluate the phenolic compounds present in the waste generated from wine production, specifically grape pomace (seeds, stems, skins), through the application of different extraction techniques, namely maceration extraction (EM), ultrasound-assisted extraction (EUA), and microwave-assisted extraction (EAM). The individual profile of phenolic compounds was determined by HPLC-DAD-ESI/MS, and the bioactive potential was evaluated through antioxidant, antimicrobial, cytotoxic, and anti-inflammatory activities. The toxicity of the obtained extracts was also tested. Finally, the extract demonstrating the highest bioactive action was incorporated into wraps (baked goods), and its performance as a preservative was tested by evaluating the microbial load over the shelf life.

In the samples obtained from grape pomace, phenolic acids, tannins, flavonoids, and stilbenes were identified. Maceration extraction showed a higher number of compounds (19 compounds), as well as a higher concentration, with a pentamer procyanidin being the most abundant compound.

Regarding the tested biological activity, the extracts showed antifungal potential and satisfactory antibacterial capacity against the studied strains. Regarding

antiproliferative capacity, extracts obtained through EM and EAU showed the best results in tumor cells. Extracts obtained from EAM and EM showed no toxicity or anti-inflammatory activity.

Considering the results with the highest concentration of phenolic compounds and the best bioactive action from the conducted assays, the maceration extract was incorporated into wraps. Three formulations were developed: control (without the addition of additives), with the addition of the extract (natural ingredient), and with the addition of the synthetic preservative (potassium sorbate - E202). The microbial load of total aerobic mesophiles, coliforms, molds, and yeasts was evaluated during a storage period (0, 3, and 7 days). The results revealed a reduction in the growth of total mesophiles up to the third day of storage compared to the control sample.

This study demonstrated the importance and innovation of the sustainable use of agro-industrial waste, such as grape pomace, for obtaining bioactive phenolic compounds and their potential as natural preservatives, contributing to the sustainability and advancement of the agri-food sector.

Keywords: Grape pomace, phenolic compounds, extraction, reuse.

1 Introdução

1.1 Sustentabilidade no setor agroindustrial

O setor agroalimentar demonstra um amplo impacto económico e social em todo o mundo, isto porque a sua produção contribui para vários domínios da sociedade, nomeadamente para a nutrição da população, para o produto interno bruto de cada país e para o aumento do número de postos de trabalho (Ponta et al., 2022).

Considerando as vantagens e benefícios deste setor, um dos grandes desafios com que se depara é alinhar o fornecimento de alimentos com os enormes custos ambientais, que englobam desde a emissão de gases no meio ambiente, até a fertilidade do solo e a perda da biodiversidade (Notarnicola et al., 2017). Outro dos grandes desafios é administrar a elevada produção de resíduos que são produzidos em toda a cadeia produtiva de alimentos, criando medidas estratégicas que contribuam para o “desperdício zero” (Ravindran & Jaiswal, 2016).

A grande demanda por parte do aumento populacional, leva a produções aceleradas que, muitas vezes, não são bem acondicionadas ou aproveitadas de forma eficiente, traduzindo-se no descarte inapropriado destes excedentes para o meio ambiente (Ravindran & Jaiswal, 2016).

Um terço dos alimentos cultivados são perdidos ou desperdiçados antes e depois de chegar ao consumidor final, por isso reciclar os resíduos gerados de forma eficiente pode ser considerado um desafio moral e económico, uma vez que possuem características que podem ser valorizadas economicamente (Dini, 2021). Assim, a criação de medidas que levem à prática da reutilização dos resíduos do setor agroalimentar pode beneficiar as indústrias, através do desenvolvimento da economia circular. Este tipo de economia visa obter cadeias de abastecimento mais eficientes, com o objetivo de criar um mundo sem desperdícios, originando comportamentos conscientes em relação aos produtos, materiais, recursos e meio ambiente (Dini, 2021; Murray et al., 2015).

Nesse sentido, para que a economia circular possa ser desenvolvida, devem ser implementadas e executadas melhorias do sistema de produção e consumo, a fim de que os resíduos gerados possam ser dispostos de forma correta para serem novamente introduzidos no setor industrial (Ponta et al., 2022).

Desta forma, para aumentar a conscientização sobre os impactos causados pela perda e o desperdício de alimentos, têm vindo a ser estabelecidas normas a curto e longo

prazo, por parte dos órgãos do governo, para que haja um melhor aproveitamento dos alimentos produzidos. Um exemplo disso, foi o facto de as Nações Unidas terem incluído nos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável da Agenda 2030, práticas que referenciam a erradicação da fome, consumo e produção de alimentos responsáveis, a fim de garantir a segurança alimentar a toda população (Amicarelli & Bux, 2020). Também, a FAO (2019) cita que os seres humanos devem “*reduzir pela metade o desperdício global de alimentos per capita nos níveis de varejo e consumidor e reduzir as perdas de alimentos ao longo das cadeias de produção e fornecimento, incluindo perdas pós-colheitas*”.

1.2 Bioresíduos gerados no setor agroindustrial

Os bioresíduos são gerados nas etapas de produção agrícola, na industrialização do produto e por parte do consumidor final. Os excedentes da produção agrícola são, geralmente, folhas, caules, flores e raízes, que auxiliam muitas vezes na manutenção das quintas e culturas, nomeadamente no que concerne à fertilização dos solos. Na indústria alimentar, para além desse tipo de excedentes, a nível fabril são gerados outros subprodutos que consistem em frutas inteiras que não atendem o padrão de qualidade proposto para comercialização, assim como cascas, polpas e sementes (Chamorro et al., 2022).

Os bioresíduos podem ser definidos, segundo o Decreto-lei n.º 73/2011, 17 de junho do Ministério do Ambiente e do Ordenamento do Território (2011) como “*resíduos biodegradáveis de espaços verdes, nomeadamente os de jardins, parques, campos desportivos, bem como os resíduos biodegradáveis alimentares e de cozinha das habitações, das unidades de fornecimento de refeições e de retalho e os resíduos similares das unidades de transformação de alimentos*”.

A Organização das Nações Unidas Para a Alimentação e a Agricultura (FAO), estima que a produção mundial de resíduos agroindustriais atinja 1,3 bilhões de toneladas por ano, sendo que, como já mencionado 1/3 dos alimentos potencialmente destinados ao consumo humano são desperdiçados, seja como resíduos, oriundos do processamento, ou como perda na cadeia produtiva (FAO, 2013). Os grupos alimentares de maiores perdas são observados nos cereais com uma representação de 31%, seguido dos vegetais (28 %), laticínios (11 %), carnes (10 %) e frutas (8 %) (Alvi et al., 2022).

Relativamente à cadeia produtiva, esses resíduos são gerados de 11 a 23% ainda na fase de produção agrícola, 17 a 19% durante o processamento industrial, 8 a 23% na fase de inspeção e mais de 50% é desperdiçada no consumo final, considerando o setor hoteleiro e doméstico (Amicarelli & Bux, 2020).

No caso particular das frutas, no ano de 2020 foram ultrapassados os 800 milhões de toneladas produzidas mundialmente como mostra a **Figura 1**. A elevada produção e práticas inadequadas de manuseamento e armazenamento gera, como consequência, uma grande quantidade de bioresíduos (Iqbal et al., 2021). De acordo com dados apresentados pela FAOSTAT, no ano de 2019, as perdas no setor de frutas correspondem a aproximadamente 20 milhões de toneladas, causando sérios problemas de gestão do ponto de vista ambiental e económico se não destinados de forma correta. Desta forma, a recuperação e valorização dos bioresíduos gerados pela indústria alimentar é uma solução promissora para enfrentar esses problemas (Chaouch & Benvenuti, 2020).

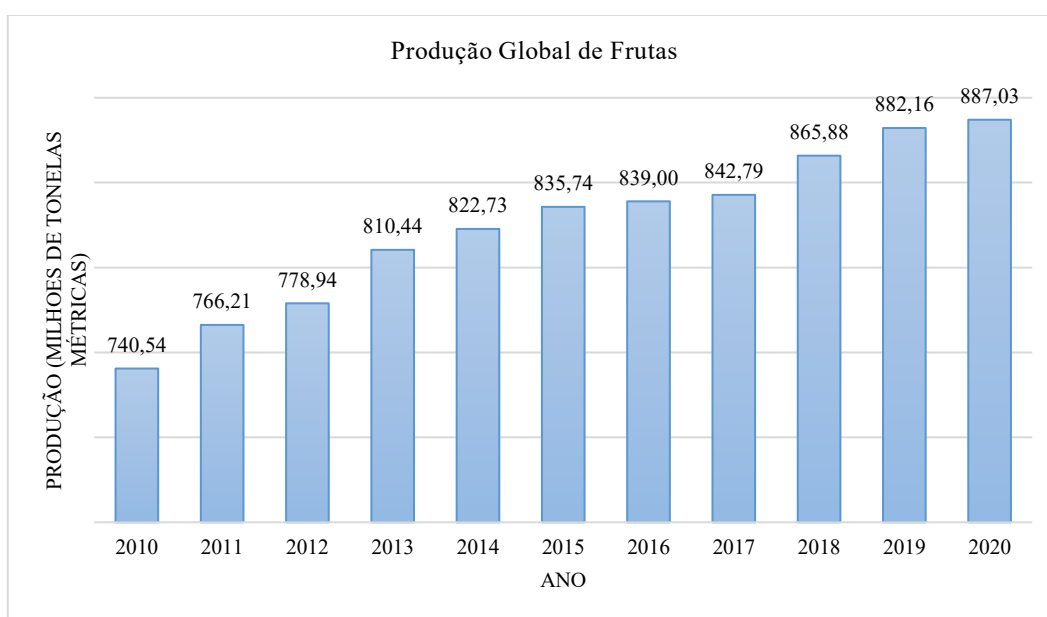


Figura 1: Produção global de frutas no período 2010 – 2020
(Fonte: Adaptado de IQBAL et al., 2021).

Os resíduos provenientes do processamento de frutas são normalmente subprodutos fibrosos, constituídos por cascas, polpas e sementes, sendo denominados como bagaço. De forma geral, o bagaço de frutas apresenta na sua composição diversos compostos, como compostos fenólicos, polissacarídeos, fitoquímicos, fibras alimentares,

antioxidantes naturais e vários outros nutrientes, que podem ser recuperados e introduzidos novamente na indústria como matéria-prima para diversas finalidades (Iqbal et al., 2021; Pintado & Teixeira 2015).

Num estudo realizado por Iqbal et al. (2021), onde apresentou uma projeção mundial da produção de bagaços e frutas cítricas, uva e maçã, estima-se que anualmente, entre o período de 2021 a 2025, mais de 20 mil toneladas métricas devem ser produzidas mundialmente.

Na tentativa de redução do desperdício e reutilização de frutas e seus excedentes, a extração de componentes de alto valor como proteínas, polissacarídeos, fibras, compostos de sabor e fitoquímicos estão a ser, cada vez mais, estudadas e utilizadas como ingredientes em preparações nutracêuticas e para o desenvolvimento de alimentos funcionais (Kumar et al., 2017).

1.3 Compostos bioativos presentes nos bioresíduos

Os compostos bioativos são definidos como substâncias com atividades biológicas capazes de modular processos metabólicos, encontrados em pequenas quantidades nos alimentos e considerados importantes para a manutenção da saúde humana. Estes têm sido associados como potenciais fontes de antioxidantes, atividade antimicrobiana, anticancerígena, inibição ou indução de enzimas, entre outros (Dini, 2021; Kumar et al., 2017; Barros et al., 2017; Shirahigue & Ceccato-Antonini, 2020).

Os compostos bioativos apresentam uma extensa gama de moléculas, que se dividem em várias classes como: os compostos fenólicos, carotenoides e tocoferóis, entre outros como pode ser observado na **Figura 2**.

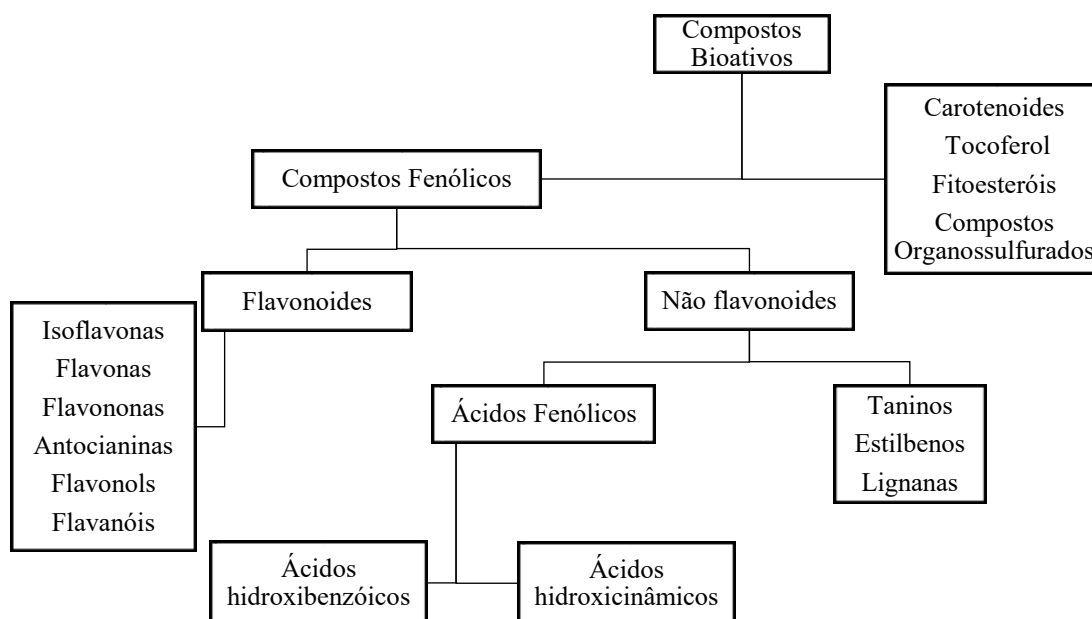


Figura 2: As principais classes de compostos bioativos
(Fonte: Adaptado de Shirahigue & Ceccato-Antonini, 2020)

Por exemplo, os carotenoides são encontrados, principalmente, nas cascas e na polpa dos frutos conferindo coloração entre o amarelo e o vermelho-escuro. Atuam como precursores da vitamina A, contribuem para a capacidade antioxidante e anti-inflamatória dos vegetais e evidenciam, também, efeito vasodilatador; ação antialérgica; anti-hepatotóxica; antiulcerogénica; ação antiplaquetária; bem como ações antimicrobianas e antivirais (Tiwari et al., 2019; Lopes, 2015).

Os tocoferóis são, também, antioxidantes encontrados naturalmente em alimentos de origem vegetal como em frutas, vegetais verdes-escuros, sementes oleaginosas, óleos vegetais e no gérmen de trigo. São classificados de acordo com o número e a posição dos substituintes metil na porção do anel fenólico em isômeros. No organismo, estes compostos desempenham atividades relacionadas com o retardamento e a proteção de doenças crônicas não transmissíveis, como: Parkinson, Alzheimer, tumores e doenças cardiovasculares (Zayed et al., 2021; Becker et al., 2010).

Desta forma, os bioresíduos obtidos a partir do processamento de frutas são uma matriz de interesse para a obtenção destes compostos, por apresentar na sua composição

cascas, talos, polpa e sementes que possuem estrutura química de alta complexidade, compostos bioativos e outros compostos de interesse (Simões et al., 2021).

Considerando todo o potencial promissor destes excedentes da indústria, diversos estudos têm sido realizados utilizando os bioresíduos de frutas para a obtenção de compostos bioativos.

Tiwari et al. (2019) estudaram resíduos biológicos de cenoura para extração de carotenoides e obtiveram resultados satisfatórios em relação a atividade antioxidante e ao elevado teor de β -caroteno.

Narváez et al. (2020) caracterizaram o óleo de semente de goiaba e identificaram na sua composição fitoesteróis, tocoferóis e compostos fenólicos. Entre os fitoesteróis e tocoferóis, β -sitosterol e γ -tocoferol foram os mais abundantes.

Zayed et al. (2021) desenvolveram um estudo para a valorização da extração de sementes cítricas para aplicações em alimentos funcionais. Os compostos bioativos encontrados foram tocoferóis, carotenoides e compostos fenólicos, e a semente de toranja entre as sementes cítricas analisadas, provou a sua eficácia para ser usada em preparações cicatrizantes, antioxidantes, antibacterianas e antidiabéticas.

Sicari et al. (2017) utilizaram casca seca de laranja como agente gelificante alternativo para a produção de marmelada e avaliaram a atividade antioxidante e os compostos bioativos. Nesse estudo foram identificados ácidos fenólicos (ácido clorogénico e ácido cafeico), flavonoides e antocianinas. Verificou-se também que a adição da casca de laranja aos produtos alimentares retardou a formação de HMF (hidroximetilfurfural) e a diminuição da capacidade antioxidante.

Considerando os compostos bioativos disponíveis em matrizes de frutas, destacam-se os compostos fenólicos como os mais estudados devido aos seus diversos benefícios associados a saúde humana (Routray et al., 2022).

1.3.1 O caso particular dos compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são metabolitos secundários das matrizes vegetais. São caracterizados por uma estrutura formada por um anel aromático, com um ou mais substituintes hidroxílicos, que variam de moléculas elementares monofenólicas a compostos altamente polimerizados. Estes compostos são encontrados em matrizes

vegetais na forma livre ou conjugada com açúcares, proteínas e outros compostos (Dini, 2021; Beres et al., 2017; Kumar & Goel, 2019).

Os compostos fenólicos, são divididos em várias classes entre elas os ácidos fenólicos, taninos, estilbenos, lignanas e flavonoides, sendo os flavonoides a maior classe e a mais encontrada em alimentos. Esses compostos estão relacionados, principalmente, com a defesa das plantas contra estresses bióticos e abióticos, pragas e patógenos, desempenhando, assim, uma ação antioxidante e antimicrobiana de grande interesse (De Camargo et al., 2018; Zhang & Tsao, 2016).

Os ácidos fenólicos são polifenóis não flavonoides, divididos em ácidos hidroxibenzóicos (ácido gálico, *p*-hidroxibenzóico e siringico) e hidroxicinâmicos (ácidos cafeicos, *p*-cumárico, ferúlico), são, essencialmente, encontrados em frutas, vegetais, grãos integrais (aveia, cevada, arroz, trigo, milho) e leguminosas (grão-de-bico, soja, lentilha, feijão, entre outros) (Chedea et al., 2022; Cuevas-Rodríguez & Oseguera-Toledo, 2022)

De outro modo, os estilbenos são compostos formados por dois anéis aromáticos ligados pelo radical etileno e aparecem naturalmente no amendoim, na família das leguminosas, bagas, vinho e sumo de uva. A molécula mais estudada é o resveratrol e seus derivados (Puangpraphant, Cuevas-Rodríguez & Oseguera-Toledo, 2022).

Relativamente aos taninos, estes podem ser classificados em dois grupos: taninos condensados ou não hidrolisáveis (proantocianidinas) e taninos hidrolisáveis (elagitaninos). O primeiro grupo é encontrado em sementes e cascas de frutas e o segundo são considerados os principais compostos fenólicos disponíveis em sementes (Chedea et al., 2022; Puangpraphant, Cuevas-Rodríguez & Oseguera-Toledo, 2022).

Por sua vez, os flavonoides estão, principalmente, presentes na casca dos alimentos e são reconhecidos pela sua capacidade antioxidante, evidenciando ação protetora contra os radicais livres (Puangpraphant, Cuevas-Rodríguez & Oseguera-Toledo, 2022).

Desta forma, os compostos fenólicos possuem propriedades que são objeto de vários estudos por parte da comunidade científica, nomeadamente a ação antioxidante (Neves, 2015; Zardo, 2019), antimicrobiana, antitumoral, antidiabética, anti-inflamatória e protetora da radiação ultravioleta (Dini, 2021).

Marques et al. (2017) realizou análises em farinha obtida a partir de bagaço de acerola e o extrato apresentou uma grande concentração e variedade de compostos fenólicos com potencial bactericida e potencial antioxidante (a capacidade de captação de radicais DPPH (2,2 –Difenil-1-picrilhidrazil)) foi maior que 70% (Caetano et al., 2009).

Ferreira (2010) avaliou separadamente o bagaço de uva, as sementes e as cascas. A fração das sementes foi a que apresentou maiores conteúdos de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante.

Deng et al. (2012) analisaram a relação da atividade antioxidante e os compostos fenólicos presentes em resíduos de 50 frutos (cascas e sementes) e constataram que os compostos fenólicos estão correlacionados com o potencial antioxidante. Observaram, também, que os compostos bioativos foram encontrados em maior quantidade nas cascas e sementes comparativamente com as polpas.

Arbos et al. (2013) avaliaram atividade antimicrobiana, antioxidante e o teor de compostos fenólicos de extrato hidroalcoólico obtido a partir da casca e semente de frutos de manga. O extrato da casca apresentou teores de compostos fenólicos totais significativamente superior, assim como melhores resultados de atividade antioxidante e antimicrobiana.

Para que estes compostos sejam recuperados de forma eficiente e assim reintroduzidos como ingredientes funcionais em produtos alimentares e nutracêuticos, várias técnicas de extração têm que ser estudadas. Isto porque, trata-se de moléculas de alta sensibilidade, sendo importante avaliar todos os fatores envolventes para promover uma elevada extratibilidade mantendo a estabilidade e o seu potencial biológico (Majumde & Annegowda, 2021).

1.4 Técnicas de extração

A extração consiste numa operação de transferência de massa com o objetivo de captar os compostos de interesse de uma matriz, através de processos químicos ou físicos. Ao realizar-se o processo de extração nas matrizes vegetais, deve considerar-se a parte da matriz utilizada e os compostos que se desejam extrair (Vieira, 2015).

Desta forma, a eficiência da extração de compostos bioativos depende de vários fatores, nomeadamente da matriz vegetal utilizada, do método aplicado, da disponibilidade desses compostos nas matrizes biológicas, (forma livre, ligações com

outras biomoléculas), da estabilidade das moléculas pretendidas, da temperatura aplicada, do solvente utilizado, entre outros (Dini, 2021; Routray et al., 2022). Por isso, selecionar o método de extração que permita uma maior extratibilidade é de extrema importância, pois influenciará diretamente o rendimento final do extrato e a concentração de compostos de interesse (Bondam et al., 2022).

Os métodos convencionais de extração utilizados durante muitos anos, geralmente realizados com técnicas de refluxo, maceração a frio, soxhlet e destilação simples, apresentam algumas desvantagens se comparadas com técnicas não convencionais (extração assistida por micro-ondas e extração assistida por maceração), como o maior custo operacional, menor rendimento, maior consumo de energia, maior tempo de extração e maiores quantidades significativas de solventes (Cigeroglu et al., 2020; Bandar et al., 2013).

A extração por maceração (EM) é uma técnica bastante utilizada e apresenta como principais desvantagens a utilização de solventes não permitidos na indústria alimentar, altas temperaturas e tempo prolongado de extração, que podem levar a degradação dos compostos fenólicos. Porém, apresenta como vantagem baixo custo de operação e facilidade de manuseio (Kumar et al., 2017).

Com o avanço dos processos tecnológicos, técnicas emergentes de extração foram citadas por apresentarem benefícios significativos frente as técnicas convencionais comumente utilizadas. Desta forma, as técnicas emergentes possuem maior eficiência, menor tempo e um menor consumo de solventes. Essas técnicas são consideradas como ambientalmente convenientes, por não fazerem uso de solventes tóxicos no seu processo (Alvi et al., 2022).

São várias as técnicas de extração emergentes aplicadas: extração de dióxido de carbono supercrítico, extração de água subcrítica, extração de líquido pressurizado, extração assistida por ultrassons e extração assistida por micro-ondas, sendo as duas últimas as mais aplicadas (Gomez et al., 2020; Kumar et al., 2017).

A EAM foi desenvolvida para a extração de compostos como antioxidantes, compostos aromáticos, óleos essenciais, pigmentos e outros compostos orgânicos obtidos a partir de amostras sólidas de alto valor (Alvi et al., 2022). A técnica consiste na utilização de ondas eletromagnéticas, com uma frequência geralmente de 2450 MHz, equivalente a cerca de 600-700 watts. O princípio básico é que a energia absorvida pelo

micro-ondas no processo de passagem pelo meio é convertida em energia térmica, o que facilita o processo de extração. O aquecimento por micro-ondas induz a rotação dipolar de moléculas e migração de iões, difusão de solvente e dissolução de componentes devido à rutura das ligações de hidrogénio (Iqbal et al., 2021).

Outra metodologia muito utilizada para extração de compostos fenólicos de bioresíduos de frutas é a EAU (Dini, 2021). O mecanismo de funcionamento, normalmente, é de cavitação que gera a compressão e expansão da matriz, causando a permeabilização da parede celular e aumento do rendimento dos compostos desejados. Com o aumento dos ciclos de compressão e refração ocorre o aumento da extração (Iqbal et al., 2021).

1.5 Subprodutos alimentares: medidas estratégicas para a criação de soluções industriais sustentáveis

O desperdício de alimentos pode ser relacionado com vários problemas, nomeadamente sociais (como é o caso da desnutrição) e ambientais, causando anualmente a libertação de 3,3 bilhões de toneladas de CO₂ na atmosfera e dioxinas (Dini, 2021).

Uma das razões que leva à baixa taxa de reciclagem é o reduzido custo de descarte dos excedentes, comparativamente com o custo de reciclagem/conversão dos mesmos.

No entanto, torna-se cada vez mais urgente a análise e definição de estratégias de gestão de resíduos, para que sejam criadas e aplicadas soluções tecnológicas, como o desenvolvimento de sistemas de colheita para digestão anaeróbica de resíduos biodegradáveis mistos, compostagem e incineração, a produção de biocarvão ou bioenergia (por exemplo, biogás, biodiesel), ou extrair metabólitos primários e secundários para uso em cosméticos, produtos farmacêuticos e suplementos alimentares (Dini, 2021). Tudo isto contribuirá para o desenvolvimento de toda a cadeia alimentar, promovendo o incremento da economia circular, a inovação e a valorização de recursos.

1.6 Caracterização, origem e produção da uva

As uvas são frutos silvestres produzidos por plantas do género *Vitis*, domesticadas há mais de 6000 anos. É uma baga disposta em cacho que apresenta várias formas, podendo ser esférica, ovoide ou elipsoide, com pesos e tamanhos variados. Pode também apresentar diversas colorações, podendo ser verde, branca, dourada, rosada, rubra,

azulada ou preta, e o seu aroma e o sabor vão do doce ao adstringente (Aires et al., 2021; Venkitasamy et al., 2019).

Atualmente no mundo existem cerca de 8.000 a 10.000 cultivares de uvas *V. Vinífera*, 33 variedades ocupam 50% da área cultivada. Mundialmente são uma das frutíferas mais populares, comercializadas e consumidas *in natura* ou como produtos processados, como vinhos, uvas passas, uvas de mesa, sucos, geleias e para diversas outras destinações. O cultivo de uva varia em todo o mundo de acordo com a aptidão do cultivo, resistência a doenças, cor, sabor, textura e muitas outras características. Durante o ano de comercialização 2019/2020 a produção global de uva foi de cerca de 23,8 milhões de toneladas métricas, os países com maior produção de uva de mesa são China, seguido da Índia e Turquia, respetivamente. De outro modo, países como Itália, França, Espanha e Argentina são países especializados na produção de vinho (Sabra et al., 2021; Bares et al., 2017; Venkitasamy et al., 2019).

De acordo com a Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV), em 2020, Portugal registrou uma produção de vinho de aproximadamente 6,4 milhões de hectolitros, posicionando-o como o décimo primeiro maior produtor de vinho do mundo. Além disso, foram colhidas cerca de 853.384 toneladas de uvas frescas e 17.849 toneladas de uvas de mesa no país. Esses dados fornecidos pela OIV refletem a importância e o impacto significativo da indústria vitivinícola portuguesa.

1.6.1 Bagaço de uva

O bagaço de uva é o principal resíduo das indústrias de processamento de sumos e vinhos, tendo na sua composição moléculas promissoras para o desenvolvimento de novos produtos alimentares (Monteiro et al., 2021).

De acordo com um estudo realizado por Spigno et al. (2017), o bagaço é, geralmente, descartado nas indústrias de processamento de uva, tornando-se o principal resíduo sólido produzido, representando cerca de 60% do total e cerca de 20% a 25%, em peso, das uvas utilizadas. A maior utilização das uvas produzidas no mundo é na indústria vinícola, rondando cerca de 75% da produção total (Iqbal et al., 2021).

Os resíduos obtidos correspondem a peles prensadas (75%), sementes (22%), polpa residual e caules (3%). Em termos de matéria seca, cerca de 75% do bagaço de uva

é fibra alimentar, principalmente composto por celulose, hemicelulose e pectinas (Iqbal et al., 2021).

No Brasil e na Europa, o bagaço de uva, normalmente, tem como destino a aplicação no solo, como por exemplo em aterros ou como biofertilizantes, a incineração ou para a alimentação animal (Monteiro et al., 2021). O interesse pelo bagaço de uva como fonte potencial de compostos fenólicos ocorre porque este subproduto possui uma concentração significativa de polifenóis devido à maceração incompleta durante o processo de vinificação (Nayak et al., 2018).

1.6.2 Composição nutricional e química

O bagaço de uva é composto por macro e micronutrientes como as proteínas, lipídeos, hidratos de carbono, vitaminas e compostos bioativos, bem como por compostos fenólicos (Monteiro et al., 2021).

A casca da uva contém uma grande quantidade de ácidos hidroxicinâmicos, antocianinas (conferem a coloração vermelha após o amadurecimento) e flavonoides glicosídeos, enquanto os flavonóis estão presentes principalmente nas sementes (Iqbal et al., 2021). As sementes de uva contêm 13 a 19% de óleo, que é rico em ácidos gordos essenciais, cerca de 11% de proteína, 60 a 70% de hidratos de carbono não digestíveis e antioxidantes não fenólicos, como tocoferóis e betacaroteno (Yu & Ahmedna, 2012).

Num estudo realizado por Sousa et al. (2014) foi feita a avaliação da composição química da farinha do bagaço de uva e obtiveram-se valores de humidade de 3,33g/100g, acidez de 0,64g de ácido cítrico/100g e cinzas de 4,65g/100g. A quantidade de fibra alimentar total foi de 46,17g/100g, carboidrato (29,2g/100g), proteína (8,49g/100g) e lipídios (8,16g/100g). E em relação aos compostos com propriedades funcionais, foram observados maiores valores de fibra insolúvel 79% (36,4g/100g); vitamina C (26,25 mg de ácido ascórbico/100g) e antocianinas (131mg/100g).

Também Prozil (2012) avaliou a composição química dos engaços de uva provenientes de bagaço de uva tinta, testando o seu valor nutricional. Estes autores obtiveram uma concentração de cinzas de 7%, celulose de 30,3%, proteínas 6,1%, taninos 15,9%, lignina 17,4%, hemicelulose 21%. Minerais detetados: potássio (0,9%), cálcio (0,15%), magnésio (0,02%), zinco (0,01%), sódio (<0,01%).

Moro et al. (2021) determinou os compostos fenólicos de bagaço de uva, identificando sete compostos fenólicos de quatro classes nomeadamente: ácidos gálico, siríngico e vanílico (ácidos hidroxibenzoicos), procianidina B2 (proantocianidina), catequina e epicatequina (flavan-3-óis) e quercetina (flavonol).

O conteúdo fenólico total encontrado no bagaço de uva por Theagarajan et al. (2019) foi de 280,6 equivalentes de ácido gálico por grama de bagaço seco (mg GAE/g de bagaço seco), já os resultados encontrados por Moro et al. (2021) foram de 118,1 mg GAE/g de bagaço seco. Já em estudo realizado por Ferreira (2010) compara a diferença de compostos fenólicos presentes no bagaço de uva e nas demais partes da uva (**Tabela 1**).

Tabela 1: Principais compostos fenólicos em diferentes frações da uva

Compostos	Bagaço de uva	Cascas	Sementes	Ráquis
Ácidos fenólicos	0,03 – 8,31	0,17 – 8,23	0,10 – 0,11	0 – 0,04
Flavan-3-óis totais	0,34 – 4,25	0,12 – 3,38	3,56 – 6,15	0,22 – 0,89
Antocianidinas totais	11,47 – 29,82	11,47 – 29,82		
Flavonoides totais	0,03 – 0,63	0,48 – 0,63	0,02 – 0,05	0 – 0,22

Fonte: (Adaptado de Ferreira, 2010)

Considerando os estudos anteriormente realizados e disponíveis na literatura, a composição do bagaço de uva varia de acordo com as condições climáticas e práticas da viticultura, variedade, maturidade, condições sanitárias e o processamento (Venkitasamy et al., 2019).

1.6.3 Aplicações industriais e benefícios

Tradicionalmente o bagaço de uva é utilizado para a produção de diferentes destilados, fertilizantes ou ração animal. No entanto, nos últimos anos a demanda por ingredientes saudáveis e naturais de fontes alimentares tornou o bagaço de uva um ingrediente natural promissor, com características antioxidantes e conservantes, capaz de fazer frente aos aditivos sintéticos comercialmente aplicados (Bordiga et al., 2019).

Até à data, foram realizados alguns estudos com os excedentes obtidos na indústria do processamento de uva e constatou-se que a farinha do bagaço de uva pode substituir as farinhas tradicionais e fortificar produtos alimentícios. Desta forma, a adição

da farinha de bagaço de uva foi utilizada na elaboração de cereais matinais à base de milho, apresentando elevado teor de fibras (21,89g/100g de amostras base seca (b.s)) e com alta capacidade antioxidante (188 $\mu\text{mol trolax.g}^{-1}$ de amostra b.s) (Ferreira, 2010). Para além disso, Theagarajan et al. (2019) utilizou bagaço de uva em pó, em diferentes concentrações, para desenvolver cookies funcionais, e verificou que não correram alterações significativas nos parâmetros físicos, porém verificou-se um aumento do teor de fibras e proteínas e uma ação antioxidante moderada em todas as concentrações.

Por outro lado, a aplicação da farinha de casca de uva na formulação de *snacks* extrusados Bender et al. (2016) detetou a presença de resveratrol, luteolina e kaempferol, indicando a presença de moléculas antioxidantes na farinha.

Não obstante, também as sementes de uva podem ser utilizadas, nomeadamente para a extração de óleo, pela sua composição em ácidos gordos, tornando-se um potencial ingrediente em aplicações de cosméticos e alimentos (Cecchi et al., 2019; Iqbal et al., 2021). O extrato obtido a partir de semente da uva tem sido estudado devido ao seu potencial na prevenção de algumas doenças. Isto porque, este extrato contém quantidades promissoras de proantocianidinas que intervêm na eliminação de radicais livres contra o anião superóxido e radical hidroxilo (Topalović et al., 2020).

2 Objetivos

Anualmente, são desperdiçados no setor agroalimentar milhões de bioresíduos ao longo de toda a cadeia, desde a produção agrícola até aos consumidores finais. Considerando esta problemática, é importante estabelecer medidas estratégicas para a redução dos mesmos, fazendo o seu reaproveitamento e valorização.

Uma vez que esses bioresíduos são um potencial fonte de compostos bioativos, o seu reaproveitamento e aplicação na indústria alimentar como possíveis ingredientes funcionais e conservantes irá permitir o incremento socioeconómico e a sustentabilidade do setor, o desenvolvimento da economia circular, assim como, proporcionar uma gama de alimentos mais saudáveis (alimentos funcionalizados) ao consumidor.

Neste sentido e, considerando que a indústria do processamento de uva gera uma grande quantidade de subprodutos, este trabalho teve como objetivo avaliar a extratabilidade dos compostos fenólicos presentes nos resíduos do processamento do vinho - bagaço de uva (sementes, talos, cascas), através da aplicação de diferentes técnicas de extração (extração por maceração, extração assistida por ultrassons e extração assistida por micro-ondas). Para além disso, foi avaliado o potencial bioativo dos 3 extratos obtidos e incorporado o extrato com maior ação bioativa num *wrap* (produto alimentar da indústria de panificação). Para avaliar o desempenho do extrato incorporado como conservante foi avaliada a carga microbiana ao longo do tempo de prateleira do produto.

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- i) Aplicação e avaliação de diferentes metodologias de extração para avaliação da extratabilidade de compostos fenólicos no bagaço de uva: a) EM, à temperatura ambiente; b) (EAU); c) (EAM); d) determinação do perfil fenólico individual dos 3 extratos obtidos, utilizando técnicas de análise cromatográficas - HPLC-DAD-ESI/MS;
- ii) Avaliação do potencial bioativo dos extratos obtidos pelos três métodos de extração aplicados, através dos ensaios de atividade antioxidante, citotóxica, hepatotóxica, anti-inflamatória e antimicrobiana (antifúngica e antibacteriana);
- iii) Incorporação, na forma livre, do extrato com melhor ação biológica num produto alimentar;
- iv) Avaliação do potencial conservante do extrato incorporado, através da avaliação da carga microbiana ao longo do tempo de prateleira do produto alimentar.

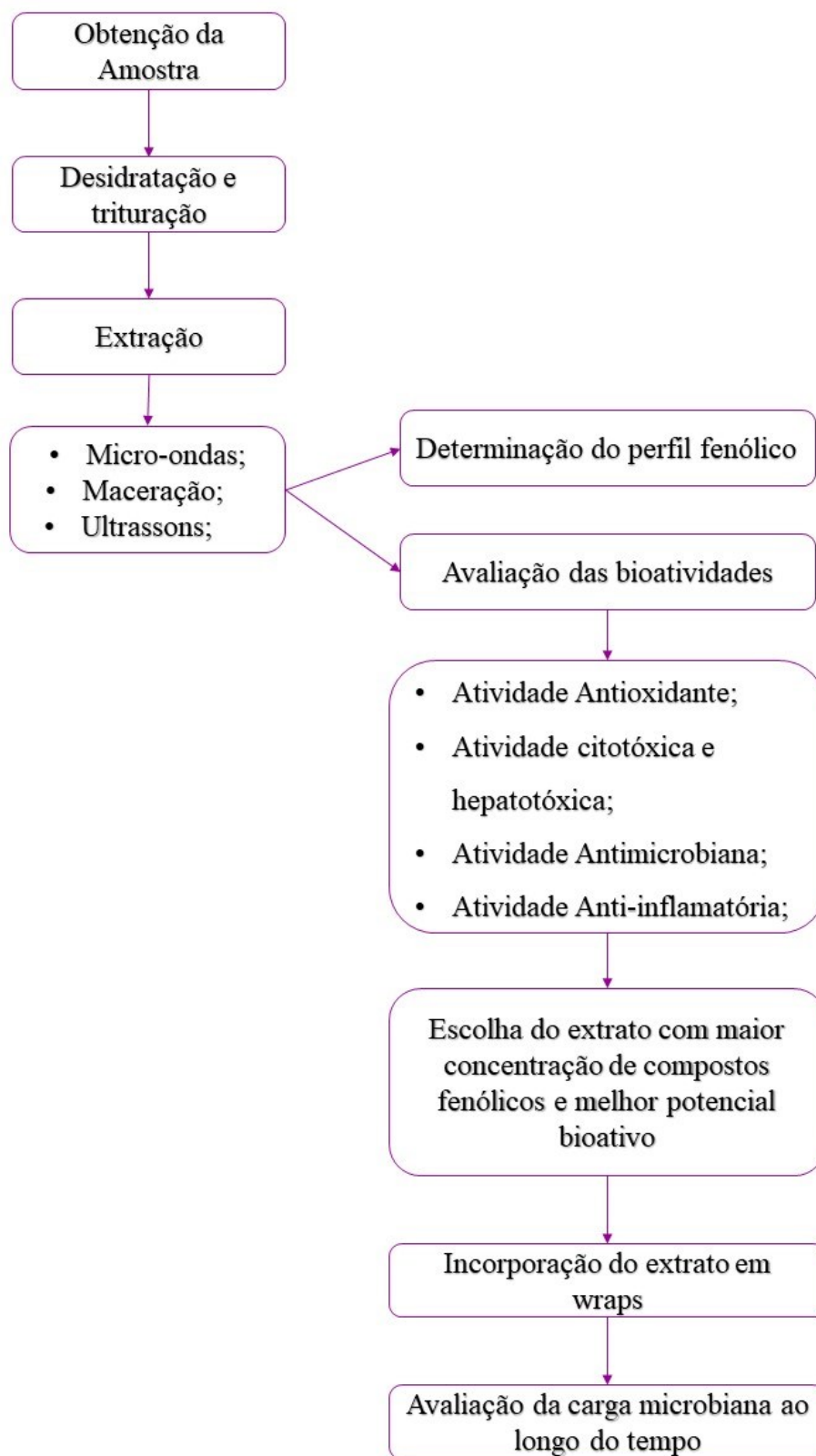


Figura 3: Representação esquemática dos objetivos da dissertação.
(Fonte: do autor, 2022).

3 Material e métodos

3.1 Amostras em estudo: aquisição e processamento

As amostras usadas neste estudo consistem em bagaço de uva, fornecidos pela empresa Destildouro (Folgosa, Portugal) na forma fresca. A amostragem é constituída por sementes, talos e cascas resultantes do processamento da uva em vinho. Após a sua receção, a amostra foi desidratada por liofilização e triturada até obtenção de um pó fino e homogéneo para posteriores análises (**Figura 4**).



Figura 4: (A) Amostra do bagaço de uva desidratada; (B) Amostra do bagaço de uva triturada. (Fonte: do autor, 2022).

3.2 Padrões e reagentes

3.2.1 Análise química: determinação do perfil fenólico individual

Etanol, metanol e acetonitrilo (99,9%; grau HPLC) foram fornecidos pela empresa Fisher Scientific (Leicestershire, Reino Unido). A água destilada foi obtida através de um sistema de purificação de água Milli-Q (TGI Pure Water Systems, Greenville, SC, EUA). O ácido fórmico foi adquirido na empresa Prolabo (VWR International, França). Os padrões de compostos fenólicos foram adquiridos na empresa Extrasynthese (Genay, França).

3.2.2 Estudos das bioatividades

Atividade citotóxica e hepatotóxica: Os padrões e reagentes, tais como o soro fetal de bovino (SFB), a *L*-glutamina, a solução salina de Hank's (HBSS), a solução de

penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 mg/mL) e o meio DMEM (meio de cultura para células animais (Dulbecco Modified Eagle), foram adquiridos na empresa Hyclone (Logan, Utah, USA). A empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) forneceu o ácido acético, a elipticina, a sulforodamina B (SRB), o ácido tricloroacético (TCA) e o Tris. A água foi tratada como referido anteriormente na **secção 3.2.1**.

Atividade anti-inflamatória: O Griess Reagent System Kit foi adquirido na Promega (Madison, WI, USA). As células RAW 264.7 foram compradas na ECACC (“European Collection of Animal Cell Culture”) (Salisbury, UK) e o DMEM na empresa Hyclone (Logan, Utah, USA).

Atividade antimicrobiana: O composto cloreto de iodonitrotetrazólio (INT) foi adquirido na empresa Panreac Applichem (Barcelona, Espanha). O Mueller-Hinton ágar (MH) ou (MHB) foi adquirido na Biolab (Hungria). Os antibióticos Vancomicina e Imipenem foram adquiridos na Hikma farmacêutica (Portugal SA) e a Ampicilina na Janssen farmacêutica (Bélgica).

Atividade antioxidante: O padrão trolox (ácido 6-hydroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-carboxílico), AAPH foram fornecidos pela Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

3.3 Extração dos compostos fenólicos através da aplicação de três metodologias distintas

3.3.1 Extração por maceração

A extração por maceração foi realizada com a adição de 30 mL de uma solução hidroalcoólica etanol/água (80:20, v/v) a, aproximadamente, 1 g de bagaço de uva (**Figura 5A**). A mistura permaneceu durante 1 hora sob agitação magnética constante (150 rpm), à temperatura ambiente (**Figura 5B**). Seguidamente, o sobrenadante foi filtrado (**Figura 5C**) com o auxílio de papel filtro (Whatman N°4) e o processo foi repetido, sendo a amostra re-extraída com mais 30 mL da mesma solução de extração. O filtrado foi levado ao evaporador rotativo a uma temperatura de 40 °C (Büchi R-210, Flawil, Switzerland) para remover a fração alcoólica (**Figura 5D**) e, posteriormente, a fração aquosa restante foi congelada (**Figura 5E**) e liofilizada (FreeZone 4.5, Labconco, Kansas City, MO, USA) (**Figura 5F**).

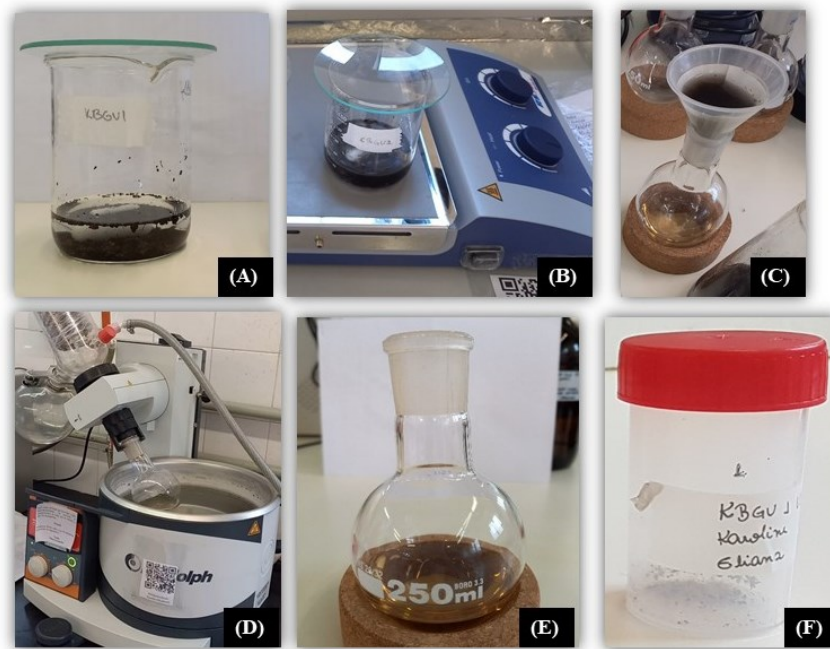


Figura 5: Etapas da extração por maceração do bagaço de uva.
(Fonte: do autor, 2022)

3.3.2 Extração assistida por ultrassons

Para a extração assistida por ultrassons foi utilizado um procedimento anteriormente descrito por [Drevelegka & Goula \(2020\)](#). Foram pesadas 8,75 g de bagaço de uva e adicionados 70 mL da solução hidroalcoólica etanol/água (50:50, v/v) (**Figura 6A**). A extração foi realizada num equipamento de sonda de ultrassons (Sonicadores QSonica, modelo CL-334, Newtown, CT, EUA) (**Figura 6B**), aplicando as seguintes condições: amplitude de 200W, temperatura de 10 °C e tempo 10 minutos. Seguidamente fez-se a filtração do sobrenadante (**Figura 6C**), a remoção da fração alcoólica através de um evaporador rotativo (Büchi R-210, Flawil, Switzerland: a uma temperatura de 40 °C) (**Figura 6D**), o congelamento da fração aquosa (**Figura 6E**) e a sua liofilização (**Figura 6F**) (FreeZone 4.5, Labconco, Kansas City, MO, USA).

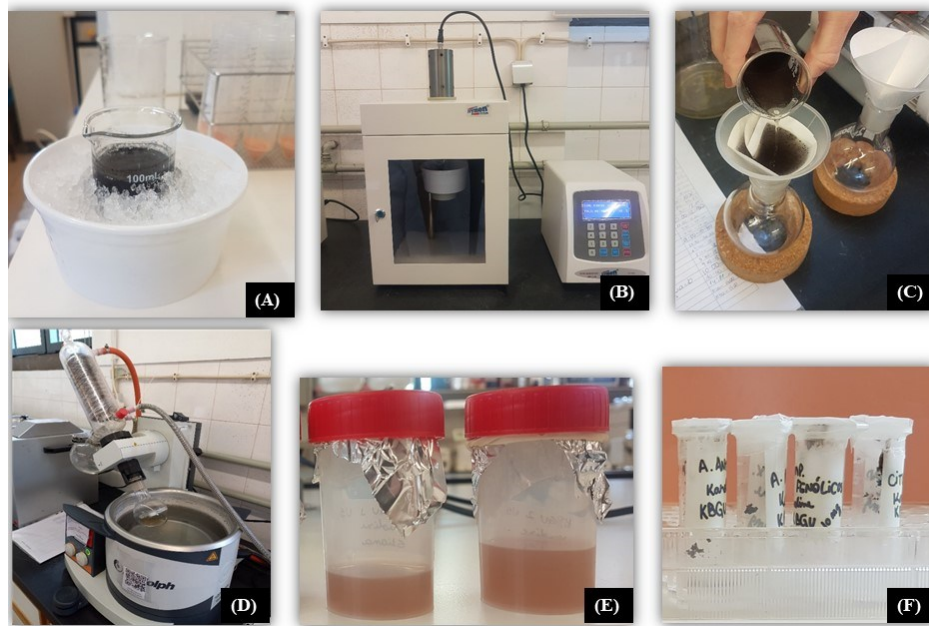


Figura 6: Etapas da extração assistida por ultrassons do bagaço de uva.
(Fonte: do autor, 2022)

3.3.3 Extração assistida por micro-ondas

Para a extração assistida por micro-ondas foi utilizado um procedimento anteriormente descrito por Drevelegka & Goula (2020). Foi feita a pesagem de 1 g de bagaço de uva e adicionados 24 mL da solução hidroalcoólica etanol/água (40:60 v/v), e a solução acondicionada num tubo de micro-ondas (**Figura 7A**). Posteriormente a extração foi realizada num equipamento de Micro-ondas (Biotage Iniciador+, Uppsala, Suécia) usando copos fechados, com potência de 408 W, 630 rpm e temperatura de 70 °C (**Figura 7B**). Seguidamente fez-se a filtração do sobrenadante (**Figura 7C**) e a remoção da fração alcoólica através do evaporador rotativo (Büchi R-210, Flawil, Switzerland: a uma temperatura de 40 °C) (**Figura 7D**) e o congelamento e liofilização da fração aquosa (FreeZone 4.5, Labconco, Kansas City, MO, USA).

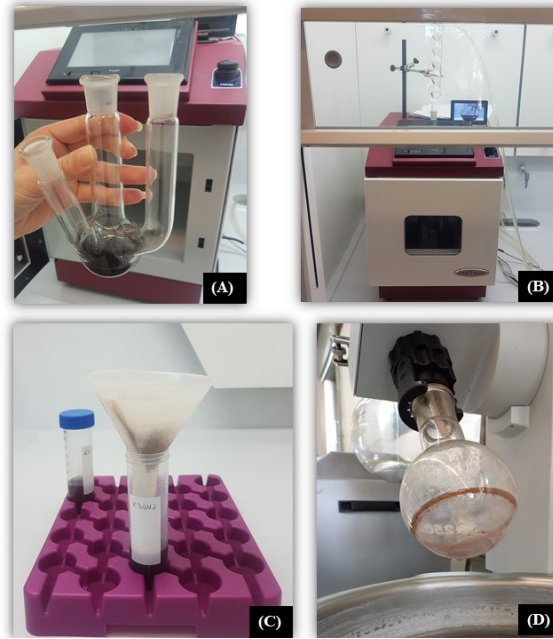


Figura 7: Etapas da extração assistida por micro-ondas do bagaço de uva.
(Fonte: do autor, 2022)

3.4 Determinação do perfil fenólico individual das amostras do bagaço de uva: análise cromatográfica

O extrato foi dissolvido em EtOH:H₂O (20:80 v/v) e filtrado com um filtro de seringa de nylon de 0,2 µm em um frasco e analisado usando um sistema de HPLC equipado com um detecor de arranjo de díodos acoplado a um detecor de espectrometria de massas (HPLC-ESI -Orbitrap-MS, Thermo Scientific), sistema equipado com injetor automático com temperatura controlada a 5°C, desgaseificador e compartimento de coluna com termostato a 35°C, conforme realizado por Barros et al. (2013). Foi realizada a detecção do composto usando um detecor de matriz de díodos (DAD) em comprimentos de onda 280, 330 e 370 nm. A separação do composto foi realizada usando coluna Waters Spherisorb S3 ODS-2 C18 (4,6 x 150 mm; 3 µm; Milford, EUA) em fase reversa empregando (A) ácido fórmico (0,1%) e (B) acetonitrilo na fase móvel a um fluxo de 0,5 mL/min em regime de eluição gradiente: 10 a 15% B por 5 minutos, 15 a 20% B por 5 minutos, 20 a 25% B por 10 minutos, 25 a 35% B por 10 minutos, 35 a 50% B por 10 minutos, e reequilibrar a coluna por 10 minutos. O sistema foi conectado a um espectrómetro de massa Íon Trap Linear LTQ XL (ThermoFinnigan, San Jose, CA, EUA) com uma fonte de ionização por eletrospray (ESI) empregando azoto como gás de arraste a 50 psi, com uma tensão de spray de 5 kV, a tensão inicial temperatura de 325°C, tensão

capilar de -20 V e tensão da lente do tubo de -66 V. Os espectros foram registrados no modo negativo entre 100 e 1.500 de razão de massa de carga (m/z), e a energia de colisão foi mantida em 35 unidades arbitrárias. A aquisição, o processamento e a interpretação dos dados foram realizados com o software Xcalibur versão 2.2 (ThermoFinnigan, San Jose, CA, EUA). Para a identificação dos compostos, o tempo de retenção (Rt), o comprimento de onda de absorção máxima (λ_{max}), íão pseudomolecular ($[M-H]^-$), espectros UV-Vis, espectros de massa e padrões de fragmentação iônica (MS2) foram comparados com literatura e padrões disponíveis comercialmente. Para a quantificação dos componentes (expressos em mg/g de extrato seco), foram utilizadas as curvas de calibração obtidas a partir dos padrões disponíveis: Curvas de calibração utilizadas: Picos 1 e 11: ácido gálico ($y=131538x+292163$, $R^2=0,9969$, LOD = 8,05 μ g /mL e LOQ = 24,41 μ g/mL); Picos 2 e 3: resveratrol ($y = 54835x - 29986$, $R^2= 0,9989$, LOD = 9,11 μ g/mL e LOQ = 4,21 μ g/mL); Pico 4: ácido protocatecúico ($y = 214168x + 27102$, $R^2= 0,9999$; LOD = 0,14 μ g/mL; LOQ = 0,52 μ g/mL); Pico 5: apigenina-7-*O*-glicosídeo ($y = 10683x - 45794$; $R^2 = 0,999$; LOD = 0,10 μ g/mL; LOQ = 0,53 μ g/mL); Picos 6-10 e 12: catequina ($y = 84950x - 23200$, $R^2 = 0,9999$; LOD 0,17 μ g/mL; LOQ 0,68 μ g/mL); Picos 15, 16 e 18: quercetina-3-*O*-glicosídeo ($y = 34843x - 160173$; $R^2 = 0,9998$; LOD = 0,21 μ g/mL; LOQ = 0,71 μ g/mL); Pico 13 e 14: quercetina-3-*O*-rutinosídeo ($y = 13343x + 7675$, $R^2 = 0,9998$, LOD = 0,1 μ g/mL; LOQ = 0,65 μ g/mL; Picos 17 e 19: luteolina-7-*O*-glicosídeo ($y = 43453x - 1354,5$, $R^2 = 0,998$; LOD = 0,40 μ g/mL; LOQ = 0,88 μ g/mL).

3.5 Avaliação das propriedades bioativas dos extratos obtidos a partir do bagaço de uva

3.5.1 Preparação dos extratos

Os extratos hidroetanólicos foram obtidos de acordo com o descrito anteriormente na *secção 3.3.1*, *secção 3.3.2*, *secção 3.3.3*. Os extratos liofilizados obtidos foram separadamente dissolvidos: numa solução hidroetanólica (EtOH/H₂O; 80:20) com concentração de 10 mg/mL para a avaliação da atividade antioxidante (*secção 3.5.2*); em meio de cultura numa concentração de 10 mg/mL foram dissolvidos para atividade antimicrobiana (*secção 3.5.3*) e em água destilada numa concentração de 8 mg/mL para

a avaliação da atividade citotóxica, hepatotóxica (*secção 3.5.4*) e atividade anti-inflamatória (*secção 3.5.5*). Posteriormente, estas soluções foram diluídas sucessivamente de forma a obter as concentrações de trabalho.

3.5.2 Atividade antioxidante

3.5.2.1 Inibição da peroxidação lipídica em tecidos cerebrais de porco através da formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico TBARS

A peroxidação lipídica pode ser determinada pelos produtos da oxidação que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBA), dando origem a compostos rosa que são conhecidos como espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS – “thiobarbituric acid reactive species”). Um dos produtos comumente usados como biomarcador de peroxidação lipídica é o malodialdeído (MDA) que se associa ao TBA na presença de iões H^+ para formar um cromógeno (MDA-TBA). Nesta metodologia, a oxidação de uma preparação rica em lípidos é induzida pela adição de um ião metálico (ferro ou cobre), e a extensão da reação com o ácido tiobarbitúrico é determinada pela capacidade dos antioxidantes, presentes na amostra, protegerem os tecidos contra o processo de oxidação, inibindo assim a formação do cromógeno (menos rosa) (Gutteridge, 1995; Ng et al., 2000).

Para a realização da análise de TBARS, procedeu-se conforme descrito por Barros et al. (2010). Cérebro de porco, obtido num matadouro local, foi dissecado e homogeneizados com um Polytron em tampão Tris-HCl gelado (20 mM, pH 7,4), para produzir um homogenato de tecido cerebral 1:2 (*p/v*) que foi centrifugado a 3000 g durante 10 min. Uma alíquota (0,1 mL) do sobrenadante foi incubada com as diferentes concentrações da solução (0,2 mL) na presença de $FeSO_4$ (10 μ M; 0,1 mL) e ácido ascórbico (0,1 mM; 0,1 mL) a 37 °C durante 1 hora. A reação foi interrompida pela adição de ácido tricloroacético (28% *p/v*, 0,5 mL), seguido por ácido tiobarbitúrico (TBA, 2%, *p/v*, 0,38 mL), e a mistura foi então aquecida a 80 °C durante 20 min. Após centrifugação a 3000 g durante 10 min, para remover a proteína precipitada, a intensidade da cor do complexo MDA-TBA no sobrenadante foi medida pela sua absorbância a 532 nm (**Figura 8**). A taxa de inibição (%) foi calculada usando a **Equação 1**.

$$\text{Taxa de inibição (\%)} = \frac{(A - B)}{A} \times 100$$

Equação 1. Equação da determinação da taxa de inibição em ensaio TBARS

Onde:

A é a absorbância do controle

B é a absorbância da solução do composto

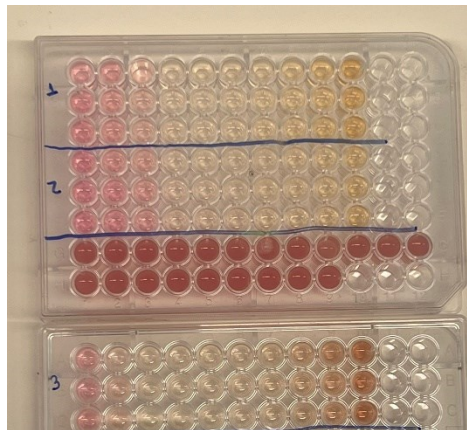


Figura 8: Ensaio de avaliação da atividade antioxidante: TBARS.
(Fonte: do autor, 2022)

3.5.2.2 Avaliação da atividade antioxidante celular (CAA)

Para avaliar a atividade antioxidante celular (CAA), os extratos hidroetanólicos obtidos a partir de bagaço de uva foram dissolvidos em água para obter uma concentração de 8 mg/mL, a partir da qual foram feitas diluições sucessivas usando 2,7-diclorodihidrofluoresceína (DCFH) preparadas com etanol e diluída com HBSS (50 µM) com o intuito de obter as concentrações a serem testadas (500 - 2000 µM).

A análise foi feita conforme descrito por Wolfe & Rui (2007). A linhagem celular utilizada foi RAW 246.7 (macrófagos de rato), mantida em incubadora a 37°C, com atmosfera humidificada com 5% de CO₂ em meio de cultura DMEM suplementado com *L*-glutamina, penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL), soro fetal bovino (10%) e aminoácidos não essenciais (2 mM).

Os macrófagos foram separados com um raspador de células e o conteúdo foi transferido para um falcon. A solução foi centrifugada durante 5 minutos a 1200 rpm. O meio foi descartado e uma nova quantidade de meio foi adicionado baseado na quantidade de precipitado obtido após centrifugação. Uma solução com densidade celular de 70 000

células/mL foi então preparada e transferida (300 µL) para microplacas pretas com fundo transparente (SPL Lifesciences) e incubadas durante 48h. Após o período de incubação, o meio foi descartado e as células foram lavadas com HBSS (2x, 100 µL), tratadas com diferentes concentrações do extrato (200 µL; 32,5 - 2000 µM) e incubadas durante 1 hora. Posteriormente, as células foram lavadas novamente com HBSS (2x, 100 µL) e uma solução de 2,2'-azobis (2- metilpropionamida) dicloridrato (AAPH) (100 µL; 600 µM) foi adicionado. A fluorescência foi lida a cada 5 minutos durante 1 hora (leitor de microplacas Biotek FLx800) a 485 nm de excitação e 538 nm de emissão. A quercetina foi usada como controlo positivo e diclorohidrofluoresceína e o meio de cultura DMEM foram usados como controlo negativo.

3.5.3 Atividade antimicrobiana

3.5.3.1 Atividade antibacteriana

Para avaliação da atividade antibacteriana aplicou-se o método de microdiluição (Clinical and Laboratory Standards Institute ([CLSI], 2009; Tsukatani, Suenaga Shiga, Noguchi, Ishiyama, Ezoe et al., 2012). Foram utilizadas bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterobacter cloacae* (ATCC 35030), *Salmonella Typhimurium* (ATCC 13311)) e Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* (ATCC 11632), *Bacillus cereus* (food isolate) *Listeria monocytogenes* (NCTC 7973)). Estes microrganismos foram adquiridos no Laboratório de Micologia do Departamento de Fisiologia Vegetal do Instituto de Investigação Biológica “Siniša Stanković” da Universidade de Belgrado na Sérvia. Foram utilizadas placas de microtitulação de 96 poços onde se determinou a concentração mínima inibitória (CIM) e concentração mínima bactericida (CMB) para cada um dos extratos avaliados.

As culturas bacterianas foram ajustadas com solução salina estéril até a concentração de $1,0 \times 10^8$ UFC/mL. Os extratos foram dissolvidos em metanol 30% e adicionados ao caldo de soja tríptico (TSB), após inoculados com bactérias na concentração final 1×10^6 UFC/poço. As microplacas foram incubadas por 24 h, a 37°C.

As CMIs das amostras foram detetadas após a adição de 40 µL de cloreto de iodonitrotetrazolium (INT; 0,2 mg/mL) e incubou-se a 37°C durante 30 min. As concentrações mais baixas sem crescimento visível de bactérias sob o microscópio ótico

foram definidas como CMIs (inibição significativa de 50% do crescimento da bactéria em comparação com o controlo positivo).

As CMBs foram determinadas por subcultivo em série de 2 µL em microplacas contendo 100 µL de TSB. A concentração mais baixa que não apresentou crescimento após esta subcultura foi considerada como CMB. Os aditivos alimentares de sulfito de sódio (E221) e metabissulfito de potássio (E224) foram usados como controlos positivos. Os resultados foram expressos em mg/mL de extrato hidroetanólico liofilizado.

3.5.3.2 Atividade antifúngica

Para a avaliação da atividade antifúngica, foi utilizada a técnica de microdiluição modificada (Daouk, Dagher & Sattout, 1995; Espinel-Ingroff, 2001). Para tal, foram usadas algumas estirpes de microfungos, tais como: *Aspergillus ochraceus* (ATCC 12066), *Aspergillus versicolor* (ATCC 11730), *Aspergillus niger* (ATCC 6275), *Penicillium funiculosum* (ATCC 36839), *Penicillium aurantiogriseum* (food isolate), *Trichoderma viride* (IAM 5061). Estes organismos foram adquiridos no Laboratório de Micologia do Departamento de Fisiologia Vegetal do Instituto de Investigação Biológica “Siniša Stanković” na Universidade de Belgrado na Sérvia.

Os fungos foram mantidos em malte ágar (MA) para a verificação da ausência de contaminação e validade do inócuo, as culturas foram armazenadas a 4°C e sub-cultivadas uma vez por mês. Os esporos fúngicos foram lavados da superfície das placas de ágar com solução salina estéril a 0,85% contendo Tween 0,1% (v/v). A suspensão de esporos foi ajustada com uma solução salina estéril para uma concentração de aproximadamente $1,0 \times 10^5$ num volume final de 100 µL por poço.

A determinação da CMI foi realizada pela técnica de diluição sucessiva em microplacas de 96 poços. As amostras foram adicionadas ao meio de malte com o inóculo fúngico e as microplacas foram incubadas durante 72 horas a 28°C. As concentrações mais baixas sem crescimento visível (usando um microscópio binocular) foram definidas como CMI.

As concentrações mínimas fungicidas (CMFs) foram determinadas por subcultura em série de 2 µL de cada poço que não apresentou mudança de cor, em microplacas contendo 100 µL de caldo de malte por poço e posterior incubadas durante 72 horas a 28°C. A menor concentração sem crescimento visível foi definida como CMF, indicando

99,5% de morte do inóculo original. Os aditivos alimentares sulfito de sódio (E221) e metabissulfito de potássio (E224) foram usados como controles positivos. Os resultados de CMI e CMF foram expressos em mg/mL de extrato hidroetanólicos.

3.5.4 Avaliação da citotoxicidade e hepatotóxica

Para a avaliação do potencial citotóxico dos extratos hidroetanólicos (80:20, v/v) obtido a partir de bagaço de uva foi utilizado o ensaio de Sulforodamina B (SRB), descrito previamente por Barros et al. (2013). Todos os procedimentos foram realizados em ambiente asséptico e em câmara de fluxo laminar (TLStar, AV-30/70), a fim de evitar contaminações.

Para testar a capacidade anti-proliferativa do extrato em células tumorais, foram usadas várias linhas celulares tumorais humanas, tais como: MCF-7 (carcinoma da mama), NCI-H460 (carcinoma de pulmão), AGS (adenocarcinoma gástrico) e CaCo2 (adenocarcinoma colorretal); obtidas no DMSMZ – Leibniz – Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. Estas linhas foram mantidas em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2 mM glutamina, 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina, incubados a 37°C com ar humidificado e 5% CO₂.

Para a realização das análises foram adicionados 8 mg de cada um dos extratos em 1 mL de água, obtendo uma concentração de 8 mg/mL. A partir das quais foram feitas diluições sucessivas, obtendo-se as concentrações a serem testadas (0,125 - 8 mg/mL).

Seguidamente, as células foram transferidas (190 µL) para uma microplaca, de forma a obter uma densidade de $1,0 \times 10^4$ células/poço, juntamente com 10 µL das diferentes diluições do extrato hidroetanólico com água (400 a 6,25 µg/mL). As microplacas foram incubadas a 37 °C e com 5% de CO₂, em ambiente húmido, após verificação da aderência das células. Todas as linhagens celulares são testadas em uma concentração de 10.000 células/poço. As microplacas foram seladas e guardadas na incubadora durante 24h até ao teste da SRB. Após tal período de incubação, adicionou-se a cada poço ácido tricloroacético frio (TCA, 10%; 100 µL), incubando-se em seguida durante 60 min a 4 °C. As microplacas foram lavadas com água desionizada e secas. Após a secagem, adicionou-se solução de SRB (0,1% em 1% ácido acético; 100 µL), ficando a placa a incubar durante 30 min à temperatura ambiente.

Posteriormente, removeu-se o SRB não aderido com a lavagem das placas por três vezes com solução de ácido acético (1%, v/v) e colocadas para secar. O SRB aderido foi solubilizado com 200 µL de Tris (10 mM; pH 7,4) num agitador de microplacas (Stat Fax-2100). A absorbância foi medida a 540 nm num leitor de microplacas (Instrumentos Bio-Tek, ELX800, Inc; Winooski, EUA), utilizando-se a elipticina como controlo positivo. Os resultados foram expressos em valores de GI₅₀ (concentração de amostra que inibe 50% de crescimento celular) em unidades de µg/mL.

3.5.5 Avaliação da atividade anti-inflamatória

Para a avaliação da atividade anti-inflamatória os extratos foram dissolvidos em água para obter uma concentração final de 8 mg/mL. Foram usadas células macrófagas RAW 264.7 de rato, de acordo com o procedimento de Jabeur et al. (2016), as células foram cultivadas em meio DMEM, suplementado com 10% de soro bovino inativado por calor e L-glutamina, a 37°C com 5% de CO₂, em ar humidificado.

As células foram soltas com um raspador de células, a densidade experimental das células foi estabelecida a 5×10^5 células/mL e a proporção de células mortas foi inferior a 5%, de acordo com o teste de exclusão de azul tripano. Seguidamente, as células foram distribuídas numa placa de 96 poços (150000 células/poço), a microplaca foi incubada durante 24 horas na incubadora com as condições previamente indicadas de forma a permitir uma adequada aderência e multiplicação das células.

Posteriormente, as células foram tratadas com diferentes concentrações dos extratos (15 µL, 0,125 - 8 mg/mL) e incubadas por uma hora, sendo a faixa de concentração testada de 6,25 - 400 µg/mL, seguido de estimulações com lipopolisacáridos (LPS) (1 µg/mL) ao longo de 24 horas.

Dexametasona (50 mM) foi usada como controlo positivo e amostras sem a adição de LPS foram usadas como controlo negativo. A quantificação do óxido nítrico foi determinada utilizando um kit de reagentes Griess (soluções de nitrofenamida, etilenodiamina e nitrito) e através da curva de calibração de nitrito (100 mM nitrito de sódio a 1,6 mM) preparada em uma placa de 96 poços. O óxido nítrico produzido foi determinado pela leitura das absorbâncias a 540 nm (leitorea de microplacas ELX800 Biotek, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA) e por comparação com a linha de calibração padrão.

Os resultados foram calculados através da representação gráfica da percentagem de inibição da produção de óxido nítrico versus a concentração da amostra e expressos em relação à concentração de cada um dos extratos que causa a inibição de 50% da produção de óxido nítrico - IC₅₀.

3.6 Incorporação do extrato mais promissor, obtidos a partir de bagaço de uva num produto alimentar

Após a realização das análises procedeu-se à incorporação do extrato com maior concentração de compostos fenólicos e melhor atividade bioativa. Nesse sentido, foi escolhido o extrato obtido a partir de EM.

Na concretização do processo de incorporação, o extrato obtido a partir do bagaço de uva foi adicionado em *wraps* ou tortilhas (como também é denominado), um produto alimentar amplamente comercializado e consumido em diversos países, principalmente pela sua versatilidade e facilidade de preparação.

Primeiramente foram determinados os tempos de armazenamento. Considerando que, os *wraps* comercializados, é recomendado consumir em 5-7 dias após a abertura da embalagem, o produto alimentar do presente estudo foi testado nos tempos 0, 3 e 7 dias de armazenamento.

As amostras com a adição do ingrediente natural foram comparadas com amostras controlo (sem adição de qualquer tipo de aditivos) e amostras com incorporação do aditivo sintético aplicado industrialmente neste produto alimentar (ácido sórbico - E200).

3.6.1.1 Preparação dos *Wraps*

O *wrap* é um produto alimentar que tem vindo a ganhar destaque pela sua fácil preparação e versatilidade culinária. Desta forma, procedeu-se à incorporação do extrato rico em compostos fenólicos, utilizando uma receita de *wraps* disponível na literatura e que apresenta textura e aparência similar aos *wraps* comercializados.

Após a escolha da receita ocorreu a preparação de três formulações (**Figura 9**), sendo uma delas denominada controlo (sem adição de qualquer aditivo), outra com a adição do extrato (ingrediente natural) e uma terceira com adição do conservante sintético comercialmente utilizado, sorbato de potássio (E202).

A quantidade do ingrediente natural, assim como a quantidade de sorbato de potássio foram definidas de acordo com o regulamento Europeu (EC N° 98/2018, 2018) que limita o seu uso a 2 g/kg em produtos de panificação, e a quantidade adicionada em gramas foi determinada usando como referência a quantidade de farinha (100%).

Os ingredientes e as concentrações utilizadas para cada formulação estão descritos a seguir:

- 125 g de farinha;
- 2,5 g de sal;
- 17,5 mL de óleo;
- 60 g água;

Para a preparação dos *wraps*, foram adicionados num recipiente todos os ingredientes, sendo que o ingrediente natural foi dissolvido em água e o aditivo sintético foi dissolvido na farinha. Após essa etapa ocorreu a homogeneização e o fracionamento da massa em porções de 20g. As porções foram cozinhadas até obterem uma aparência característica de *wraps*.

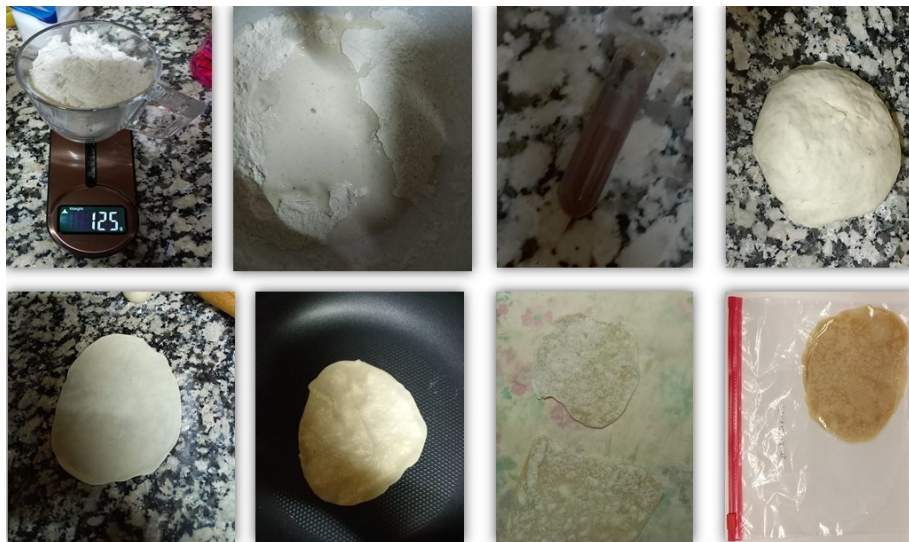


Figura 9: Etapas de preparação dos *wraps*.
(Fonte: do autor, 2022)

3.6.2 Determinação da carga microbiana do produto alimentar

3.6.2.1 Preparação do meio de cultura

A preparação dos meios de cultura microbiana seguiu o procedimento descrito pela *International Organization for Standardization* (ISO, 2003) ou conforme indicações

descritas pelo fabricante. Para cada produto alimentar é selecionado um meio de cultura específico, determinado conforme o microrganismo. Para a determinação da atividade antimicrobiana em *wraps* foram realizadas as seguintes análises: bolores e leveduras, coliformes totais e mesófilos e aeróbios totais.

Após a preparação do meio, foi feita a identificação das placas e o plaqueamento do meio para análise de bolores e leveduras em câmara de fluxo laminar.

3.6.2.2 Preparação das amostras para a análise da carga microbiana

A preparação das amostras (**Figura 10**) para a análise da carga microbiana ocorreu nos dias 0, 3 e 7. Em sacos de stomacher pesou-se 10 gramas de cada amostra de *wraps* (**Figura 10A**) e adicionaram-se 90 mL de água peptonada (**Figura 10B**), posteriormente homogeneizadas em *stomacher* (Star Blender, VWR, Radnor, EUA) por 30s (**Figura 10C**). A partir da primeira suspensão obtida (10^1), as demais diluições, adicionando em falcon 9 mL de água peptonada e um 1 mL da suspensão inicial, e assim sucessivamente até a diluição 10^{-3} para os dias 0 e 3 e 10^5 para o dia 7. Cada solução foi analisada em triplicado (**Figura 10D**).

Para a análise de coliformes totais as diluições foram inoculadas em meio VRBLA (*Violet Red Bile Lactose Agar*) (Liofilchem Co., Roseto degli Abruzzi, Itália) pela técnica de *pour plate*, em duplicata (LOQ = 1 log UFC/g). 1 mL de suspensão foi pipetado na placa (**Figura 10 E**) e 15 mL de VRBLA (Liofilchem Co., Roseto degli Abruzzi, Itália) (mantido a 50°C em um banho-maria ou incubadora) foram vertidos (**Figura 10F**), homogeneizados e deixados para solidificar. As placas foram incubadas a 30°C durante 48 h, em posição invertida.

Para a análise de bolores e leveduras (ISO 21527-1/2:2008), as diluições foram inoculadas em DRBC (Ágar dicloran rosa bengala cloranfenicol) (Liofilchem Co., Roseto degli Abruzzi, Itália) pela técnica de sementeira em meio sólido, em duplicado (LOQ = 1,7 log UFC/g). 0,2 mL das suspensões foram pipetadas numa placa contendo 15 mL do meio (**Figura 10G**) e espalhadas com um espalhador descartável (**Figura 10H**). A incubação foi feita em 25°C durante 5 dias, na posição vertical. A contagem de colônias de leveduras e fungos foi realizada separadamente após 3 dias (leveduras) e 5 dias (bolores) de incubação.

Para análise de mesófilos totais, utilizou-se a técnica de semeadura por incorporação: 1 mL de cada diluição da amostra foi colocado em placa de Petri e foram adicionados 15 mL de Plate Count Agar (PCA). O procedimento foi realizado em duplicado. As placas foram então homogeneizadas e após a solidificação do meio, foram incubadas a 30°C em posição invertida durante 72 h. A contagem foi realizada em placas contendo até 300 colônias (Limite de Quantificação (LOQ) = 1 log UFC (unidade formadora de colônia) /g).



Figura 10: Preparação das amostras para a análise da carga microbiana.
(Fonte: do autor, 2022)

3.6.3 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas usando o programa RStudio, versão 4.1.1 (R Core Team, 2021, Vienna, Austria). Os resultados dos ensaios desenvolvidos nesse estudo foram expressos em média \pm desvio padrão (SD). Com o intuito de determinar as diferenças significativas entre as amostras foi utilizado o teste t-student (aquando da análise entre duas amostras) e foi aplicada a análise de variância *one way* (ANOVA) seguida de comparações múltiplas de médias (no caso de resultado significativo) usando a função `glht` do pacote `multcomp` com ajustamento do p-value pelo método "single-step" (aquando da avaliação entre três amostras), considerando o nível de significância de 5%.

4 Resultados e discussão

4.1 Compostos fenólicos presentes no bagaço de uva

Os perfis fenólicos dos extratos obtidos a partir do bagaço de uva foram identificados por HPLC-DAD-ESI/MS, utilizando os dados cromatográficos de cada pico em termos de tempo de retenção (T_r) comprimento de onda de absorção máxima na região de UV-Vis (λ_{max}), íão pseudomolecular ($[M-H]^-$) e a fragmentação do íão molecular (MS_n), precedido de uma tentativa de identificação com base nestes dados e comparação com a literatura (**Tabela 2**).

Em todos os extratos foi possível identificar a presença de compostos fenólicos. O extrato obtido por EM apresentou, no geral, uma concentração de compostos significativamente mais elevada que os restantes, sendo identificados 19 compostos e com um teor total de 28 mg/g de extrato seco. Nesses 19 compostos, foram identificados 2 ácidos fenólicos, 6 taninos condensados, 1 tanino hidrolisável, 8 flavonoides e 2 estilbenos. Por outro lado, o extrato obtido por EAU apresentou um rendimento de 15 mg/g de extrato seco e um total de 15 compostos identificados, sendo 2 ácidos fenólicos, 1 tanino hidrolisável, 5 taninos condensados, 5 flavonoides e 2 estilbenos. Por fim, no extrato obtido por EAM foram identificados 15 compostos fenólicos (13 mg/g de extrato seco), nomeadamente 2 ácidos fenólicos, 5 taninos condensados, 6 flavonoides e 2 estilbenos.

Relativamente aos ácidos fenólicos foram tentativamente identificados 2 compostos, o pico 1 ($[M-H]^+$ a m/z 169) foi identificado como ácido gálico com base no seu espectro UV (λ_{max} 277) e a produção do fragmento MS^2 a m/z 125; e o pico 4 ($[M-H]^+$ a m/z 153) que foi identificado como ácido protocatecuico com base no seu espectro UV (λ_{max} 275) e a produção do fragmento MS^2 a m/z 135. Quando avaliada a concentração dos ácidos fenólicos, o extrato obtido por EM foi onde se obteve os melhores resultados com $1,5 \pm 0,1$ mg/g de extrato seco, seguida do extrato obtido por EAU ($1,03 \pm 0,05$ mg/g de extrato seco) e por fim, o extrato obtido por EAM ($0,55 \pm 0,01$ mg/g de extrato seco).

O grupo com maiores compostos identificados nos extratos obtidos por EAM e EAU foram os taninos com um total de 7 picos, dos quais 6 taninos condensados. O pico 6 ($[M-H]^+$ a m/z 1169) foi identificado como trímico de procianidina digalato com base

no seu espectro UV (λ_{\max} 311) e a produção dos fragmentos MS^2 a m/z 1017, 881, 729, 847, 891, 577, 289; o pico **7** ($[M-H]^+$ a m/z 1017) foi identificado como trímero de procianidina monogalato com base no seu espectro UV (λ_{\max} 321) e a produção dos fragmentos MS^2 a m/z 729, 865, 847, 577, 575, 559, 289; o pico **8** ($[M-H]^+$ a m/z 865) foi identificado como trímero de procianidina com base no seu espectro UV (λ_{\max} 311) e a produção dos fragmentos MS^2 a m/z 451, 425, 407, 289; os picos **9** e **12** ($[M-H]^+$ a m/z 865) foram identificados como tetrâmero de procianidina com base no seu espectro UV (λ_{\max} 309 e 279 respectivamente) e a produção dos fragmentos MS^2 a m/z 865, 713, 577, 575, 561, 289 e, por fim, o pico **10** ($[M-H]^+$ a m/z 1439) foi identificado como pentâmero de procianidina com base no seu espectro UV (λ_{\max} 274) e a produção dos fragmentos MS^2 a m/z 1153, 865, 713, 577, 575, 561, 289, sendo o composto maioritário dos extratos obtidos ($7,4 \pm 0,2$; $2,99 \pm 0,05$; $5,8 \pm 0,5$ mg/g de extrato, obtidos por EM, EAM, EAU, respectivamente). O tanino hidrolisável, pico **11** ($[M-H]^+$ a m/z 937) foi identificado como trigalaiol –HHDP- glicose nos extratos obtidos por EM e EAM. Em relação aos taninos condensados, o extrato obtido por EM (20 ± 1 mg/g de extrato) apresentou um nível de extração significativamente maior do que as demais extrações avaliadas e, relativamente ao tanino hidrolisável, o extrato obtido por EAU ($1,4 \pm 0,03$ mg/g de extrato) mostrou um resultado significativamente maior que o extrato obtido por EM ($0,47 \pm 0,04$ mg/g de extrato), e no extrato obtido a partir da EAM não foi detetada a presença desse composto.

Em relação ao extrato obtido por EM o grupo com maior número de compostos identificados foram os flavonoides, com um total de 8 picos. O pico **5** ($[M-H]^+$ a m/z 593) foi identificado como apigenina 6,8-C- diglicosídeo com base no seu espectro UV (λ_{\max} 324) e a produção dos fragmentos MS^2 a m/z 505, 473, 383, 353, 325; o pico **16** ($[M-H]^+$ a m/z 447) foi identificado como kaempferol-3-glicosídeo com base no seu espectro UV (λ_{\max} 315) e a produção do fragmento MS^2 a m/z 285; o pico **17** ($[M-H]^+$ a m/z 461) foi identificado como luteolina-glicuronídeo com base no seu espectro UV (λ_{\max} 346) e a produção do fragmento MS^2 a m/z 285; pico **18** ($[M-H]^+$ a m/z 463) foi identificado como quercetina-3-O-glicosídeo com base no seu espectro UV (λ_{\max} 338) e a produção do fragmento MS^2 a m/z 301. Os picos **13/ 14/ 19** foram encontrados apenas no extrato obtido a partir da EM, e foram identificados como quercetina-3-O-rutinosídeo ($[M-H]^+$ a m/z 609); kaempferol-3-O-rutinosídeo ($[M-H]^+$ a m/z 593); seringetina-3-O-hexosídeo ($[M-H]^+$ a m/z 507), respectivamente, e o pico **15** a quercetina-3-O-glucoronídeo ($[M-H]^+$ a m/z

477) foi identificada nos extratos obtidos por EM e EAM com base no seu espectro UV (λ_{\max} 328) e a produção do fragmento MS² a m/z 301. Dentre os flavonoides detetados em todas as extrações a luteolina-glicuronídeo foi o único composto que apresentou diferença significativa, para os extratos obtidos por EAU e EAM a concentração foi a mesma ($0,1 \pm 0,01$ mg/g de extrato), diferenciando se apenas do extrato obtido por EM ($0,047 \pm 0,002$ mg/g de extrato). Porém, de todos os flavonoides, a seringetina-3-*O*-hexosídeo ($0,79 \pm 0,05$ mg/g de extrato) esteve presente em maior concentração e foi obtida por EM.

Os flavonoides representam um grupo importante na classe dos compostos fenólicos, principalmente pelas suas propriedades antioxidantes (que atuam na eliminação de radicais livres) e antimicrobianas (pela capacidade de se ligar a proteínas extracelulares e solúveis, permitindo a complexação com as paredes celulares bacterianas) (Moro et al., 2021; Ballard & Maróstica, 2019). A seringetina, o flavonoide mais abundante nesse estudo, possui propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, além de efeitos benéficos para a saúde cardiovascular e prevenção do câncer. Essas propriedades estão relacionadas à sua capacidade de alterar a atividade de algumas enzimas e de modular certas vias biossintéticas (Chmiel & Stompor-Gorący, 2022).

Os restantes flavonoides identificados nesse estudo (quercetina, luteolina, apigenina) também apresentam propriedades benéficas para a saúde, auxiliando na prevenção de doenças cardiovasculares, como a aterosclerose e a também apresentaram resultados promissores na prevenção doenças como a diabetes e cancro (Ballard & Maróstica, 2019).

Outro grupo identificado nos extratos foi o dos estilbenos, onde foram tentativamente identificados 2 picos. O pico 2 ([M-H]⁺ a m/z 227) foi identificado como resveratrol com base no seu espectro UV (λ_{\max} 280) e a produção do fragmento MS² a m/z 143 e o pico 3 ([M-H]⁺ a m/z 389) foi identificado como resveratrol-3-*O*-glicosídeo com base no seu espectro UV (λ_{\max} 295) e a produção do fragmento MS² a m/z 227.

O resveratrol e seus glicosídeos são metabólitos secundários, com propriedades antimicrobianas produzida na planta em resposta ao ataque de patógenos, considerado um fungicida natural com baixa toxicidade em humanos (Yu & Ahmedna, 2012).

Tabela 2: Compostos fenólicos encontrados no bagaço de uva, obtidos por diferentes métodos de extração

Pico	Tr (min)	λ_{max} (nm)	[M] ⁺	Fragmento principal ESI- MSn [intensidade (%)]	Tentativa de identificação	Extrato obtido por maceração (mg/g)	Extrato obtido por micro-ondas (mg/g)	Extrato obtido por ultrassons (mg/g)
1	4,12	277	169	125(100)	Ácido gálico	0,65 ± 0,04 ^b	0,23 ± 0,01 ^a	0,26 ± 0,02 ^a
2	4,56	280	227	143(100)	Resveratrol	0,48 ± 0,03 ^b	0,35 ± 0,02 ^a	0,44 ± 0,02 ^{ab}
3	4,75	295	389	227(100)	Resveratrol-3-O-glicosídeo	0,84 ± 0,01 ^c	0,4 ± 0,02 ^a	0,63 ± 0,02 ^b
4	4,91	275	153	135(100)	Ácido protocatecuico	0,82 ± 0,02 ^b	0,316 ± 0,002 ^a	0,77 ± 0,03 ^b
5	5,69	324	593	505(14),473(20),383(21),353(39),325(8)	Apigenina 6,8-C-diglicosídeo	0,59 ± 0,01 ^b	0,46 ± 0,02 ^a	0,51 ± 0,03 ^{ab}
6	6,16	311	1169	1017(100),881(5),729(11),847(25),891(14),577(65),289(8)	Trímero de procianidina digalato	1,9 ± 0,1 ^c	1,3 ± 0,1 ^b	0,65 ± 0,01 ^a
7	6,52	321	1017	729(21),865(12),847(2),577(100),575(55),559(6),289(9)	Trímero de procianidina monogalato	1,0 ± 0,1 ^a	0,86 ± 0,04 ^a	0,9 ± 0,1 ^a
8	6,92	311	865	451(44),425(59),407(97), 289(65)	Trímero de procianidina	2,2 ± 0,1 ^b	1,0 ± 0,1 ^a	1,0 ± 0,1 ^a
9	7,11	309	1153	865(22), 713(4), 577(33), 575(16), 561(20), 289(100)	Tetrâmero de procianidina	1,1 ± 0,1 ^b	0,71 ± 0,05 ^a	0,7 ± 0,1 ^a
10	8,01	274	1439	1153(100),865(32),713(8),577(33),575(16),561(50),289(10)	Pentâmero de procianidina	7,4 ± 0,2 ^c	2,99 ± 0,05 ^a	5,8 ± 0,5 ^b
11	10,36	280	937	865(22), 713(4), 577(33), 575(16), 561(20), 289(100)	Trigaloil-HHDP-glicose	0,47 ± 0,04 ^a	nd	1,40 ± 0,03 ^b
12	12,32	279	1153	865(22), 713(4), 577(33), 575(16), 561(20), 289(100)	Tetrâmero de procianidina	6,5 ± 0,3 ^c	2,7 ± 0,1 ^b	0,22 ± 0,01 ^a
13	13,02	361	609	301(100)	Quercetina-3-O-rutinosídeo	0,30 ± 0,03	nd	nd
14	13,48	368	593	285(100)	Kaempferol-3-O-rutinosídeo	0,33 ± 0,03	nd	nd
15	13,75	328	477	301(100)	Quercetina-3-O-glicuronídeo	0,7 ± 0,1 ^a	0,63 ± 0,05 ^a	nd
16	14,29	315	447	285(100)	Kaempferol-3-glicosídeo	0,73 ± 0,03 ^a	0,6 ± 0,04 ^a	0,66 ± 0,05 ^a
17	15,21	346	461	285(100)	Luteolina-glicuronídeo	0,047 ± 0,002 ^a	0,1 ± 0,01 ^b	0,1 ± 0,01 ^b
18	16,04	338	463	301(100)	Quercetina-3-O-glicosídeo	0,62 ± 0,02 ^a	0,63 ± 0,04 ^a	0,58 ± 0,01 ^a
19	17,77	356	507	345 (100)	Seringetina-3-O-hexosídeo	0,79 ± 0,05	nd	nd
Total Ácidos Fenólicos						1,5 ± 0,1 ^c	0,55 ± 0,01 ^a	1,03 ± 0,05 ^b
Total Taninos Condensados						20 ± 1 ^b	9,5 ± 0,4 ^a	9 ± 1 ^a
Total Taninos Hidrolisáveis						0,47 ± 0,04 ^a	nd	1,4 ± 0,03 ^b
Total Flavonoides						4,1 ± 0,3 ^b	2,42 ± 0,2 ^a	1,85 ± 0,1 ^a
Total Estilbenos						1,33 ± 0,04 ^c	0,75 ± 0,04 ^a	1,06 ± 0,05 ^b
Total de Compostos Fenólicos						28 ± 1 ^b	13 ± 1 ^a	15 ± 1 ^a

Extrato obtidos por EM- Extrato obtido por maceração; Extrato obtido por EAM- Extrato obtido por extração assistida por micro-ondas; Extrato obtido por EAU- Extrato obtido por extração assistida por ultrassons. As diferenças estatísticas das médias foram obtidas através de uma análise de variância *one-way* (ANOVA). Em cada linha, para cada tipo de extração (maceração, micro-ondas, ultrassons) letras diferentes significam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Peixoto et al. (2018) identificaram os compostos fenólicos dos extratos do bagaço de uva obtidos por EM. O autor identificou 11 compostos fenólicos ($5,380 \pm 21$ mg/g de extrato) e a (epi) catequina tipo- β tetrâmero (1,035 mg/g de extrato) foi a principal molécula encontrada no bagaço.

Zhu et al. (2018) avaliaram o perfil fenólico do bagaço de sumo de uva por HPLC-ESI-MS, e a sua correlação com as propriedades antioxidantes. Foram identificados 26 compostos, incluindo antocianinas, flavonóis, flavan-3-óis e ácidos fenólicos.

Em estudos realizados em extratos obtidos do bagaço de uva por extração assistida por ultrassons (EAU), referente ao rendimento total de compostos fenólicos Goula et al. (2016) obtiveram 9,57 mg GAE/g de bagaço seco, valor um pouco abaixo do encontrado no presente estudo que foi de 15 ± 1 mg/g de bagaço seco, já Drevelegka & Goula (2020) ao analisarem o total de compostos fenólicos em bagaço de uva obtiveram 33,88 mg GAE/g.

Garrido et al. (2019) extraíram os compostos fenólicos do bagaço de uva Chardonnay, onde avaliaram a concentração de solvente, massa sólida e tempo extração empregando a extração assistida por micro-ondas. O perfil fenólico encontrado também apresentou uma grande variedade de flavonoides, destacando-se as procianidinas, apesar do número significativamente maior de picos (37 picos), o que pode estar relacionado com os parâmetros de extração utilizados. Outros compostos identificados em ambos os estudos foram quercetina, kaempferol e ácido gálico. O autor ainda ressalta que os polifenóis possuem atividade antioxidante, devido aos resultados encontrados no ensaio DPPH realizados no estudo.

Vale ressaltar que a diversidade e quantidade de compostos fenólicos encontrados nas amostras de bagaço de uva dependem das características de cada resíduo, nomeadamente, fatores do plantio, maturação da uva, os tipos de cultivares e condições do processamento.

4.2 Avaliação das propriedades bioativas dos extratos hidroetanólicos obtidos a partir do bagaço de uva

4.2.1 Atividade antioxidante

Para a avaliação da atividade antioxidante dos extratos hidroetanólicos obtidos a partir do bagaço de uva foram aplicados dois métodos colorimétricos *in vitro*, inibição da peroxidação lipídica (TBARS) e atividade antioxidante celular (CAA). Os resultados estão expressos na **Tabela 3**.

No ensaio de TBARS considerando que os valores de EC_{50} correspondem a 50% de inibição antioxidante (ou seja, quanto menor o valor de EC_{50} maior a capacidade antioxidante do extrato), foi possível verificar que o extrato com o resultado mais promissor foi obtido através da EM ($12,3 \pm 0,12$ $\mu\text{g/mL}$), seguido do extrato obtido por EAM ($25,8 \pm 0,37$ $\mu\text{g/mL}$) e do extrato obtido por EAU ($37,5 \pm 0,09$ $\mu\text{g/mL}$).

Em relação ao ensaio de CAA, a maior concentração de extrato testada foi de 2000 µg/mL para os três métodos de extração, sendo a EAU a técnica com o melhor resultado, onde a concentração de 2000 µg/mL foi responsável por 81% de inibição.

Através da avaliação estatística dos dados, os três métodos de extração apresentaram diferenças significativas nos dois ensaios, o que nos permite constatar que a EM tem uma capacidade de extratabilidade de compostos que atua de forma mais eficiente na inibição da peroxidação lipídica, ao contrário do CAA em que por EAU se obtêm melhores resultados.

Tabela 3: Atividade antioxidante dos extratos hidroetanólicos obtidos a partir do bagaço de uva em diferentes métodos de extração

Atividade antioxidante	Extrato obtido por maceração	Extrato obtido por micro-ondas	Extrato obtido por ultrassons
TBARS (Valores de EC₅₀, µg/mL)	12,3 ± 0,1 ^a	25,8 ± 0,4 ^b	37,5 ± 0,1 ^c
CAA (% inibição [] max testada; 2000µg/mL)	58 ± 5 ^a	74 ± 5 ^b	81 ± 5 ^c

Extrato obtidos por EM- Extrato obtido por maceração; Extrato obtido por EAM- Extrato obtido por extração assistida por micro-ondas; Extrato obtido por EAU- Extrato obtido por extração assistida por ultrassons. Valores de EC₅₀: Concentração de extrato correspondente a 50% da atividade antioxidante. Trolox (controlo positivo para TBARS) EC₅₀ = 23 µg/mL (inibição de TBARS). Controlo positivo para CAA: quercetina: 95 ± 5% inibição da oxidação em 0.3 µg/mL. Em cada linha, para cada tipo de extração (maceração, micro-ondas, ultrassons) letras diferentes significam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Foram vários os estudos realizados com interesse na avaliação da capacidade antioxidante do bagaço de uva nos últimos anos. Fazendo um levantamento, foram poucos os que avaliam a capacidade antioxidante com os ensaios citados nesse trabalho (TBARS e CAA), destacando-se mais o ensaio de DPPH e ABTS, onde avaliam a capacidade captadora de radicais DPPH· (2,2-difenil-1-picrilhidrazil); e ABTS⁺ (2,2-azinobis [3-etilbenzotiazolina] 6-ácido sulfônico) gerados respetivamente (Antoniolli et al., 2015).

Arboleda Mejia et al. (2020) analisaram o extrato de bagaço de uva vermelha obtido a partir da EAU. A capacidade antioxidante foi avaliada pelos ensaios de sequestro de radical DPPH e ABTS e apresentaram uma percentagem de eliminação de 16 ± 0,3% e 41 ± 3,5% respetivamente, o que segundo o autor é considerada uma atividade antioxidante fraca para DPPH e uma eficácia crescente ao radical ABTS. Neste estudo, os autores acreditam que o fator que contribuiu para este resultado foi o teor relativamente

baixo de compostos polifenólicos no extrato, o que evidencia a importância do estado da matéria-prima e a otimização dos parâmetros de extração.

Xu et al. (2015) também avaliaram extratos de bagaço de uva e suas atividades antioxidantes. A maior capacidade de eliminação de radicais livres foi exibida por Chambourcin, seguido por Cabernet Franc, Vidal Blanc e Viognier variando de 3,54 a 28,2 $\mu\text{mol TE/g}$ em ensaios DPPH. Para a capacidade de eliminação de ABTS os extratos apresentaram os valores entre 334 e 1013 $\mu\text{mol TE/g}$, com a ordem de Cabernet Franc, Viognier, Chambourcin, Vidal Blanc.

Ferri et al. (2017) utilizaram o método ABTS para analisar a atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva branca obtidos a partir da extração assistida por enzimas aquosas e à base de etanol de bagaço húmido (WP) e seco (DP). As amostras DP apresentaram, em média, uma atividade antioxidante 1,7 vezes maior do que as amostras WP, a maior atividade encontrada foi de 7,82 g AA eq/L no extrato de água mais etanol.

Também Nayak et al. (2018) avaliaram a atividade antioxidante pelo ensaio de eliminação de radicais DPPH do extrato de bagaço de uva Cabernet obtido a partir da extração assistida por ultrassons com utilização de diferentes solventes. Os resultados revelaram uma maior atividade antioxidante no extrato água-etanol (103,8 mg/100 g) em relação ao extrato aquoso (376 mg/100 g).

Garrido et al. (2019) extraíram antioxidantes naturais de bagaço de uva Chadonnay utilizando extração assistida por micro-ondas (EAM) e os polifenóis obtidos por EAM apresentaram uma inibição de DPPD de $87 \pm 5\%$.

Romanini et al. (2021) comparou os métodos de extração assistida por ultrassons (EAU) e extração por maceração (EM) para obtenção de compostos bioativos de bagaço de uva e diferentes análises para determinar a atividades antioxidantes (DPPH, ABTS e FRAP). Os resultados para a capacidade antioxidante dos extratos obtidos por EAU foram estatisticamente superiores ao CE, com valores de DPPH ($0,23 \pm 0,02$ e $0,12 \pm 0,01 \mu\text{mol TE/mg}$), ABTS ($305,73 \pm 4,00$ e $217,73 \pm 6,11 \mu\text{M ET/mg}$) e FRAP ($77,97 \pm 0,71$ e $60,97 \pm 0,24 \mu\text{mol de Fe}^{2+}/\text{mg}$).

Peixoto et al. (2017) avaliaram a capacidade antioxidante de extratos obtidos a partir da mistura de bagaço de uva *Vitis vinífera* L. e frações separadas das sementes e casca. No ensaio de TBARS os extratos hidroetanólicos das sementes apresentaram maior

atividade antioxidante (49,6 µg/mL), seguido da mistura (97 µg/mL) e da pele (629 µg/mL).

Negro et al. (2003) também avaliaram extratos obtidos a partir do bagaço, sementes e casca e relatou no seu estudo que a maior contribuição para atividade antioxidante do bagaço de uva é encontrada nas sementes, pela grande quantidade de proantocianidinas, que são flavonoides conhecidos pela sua elevada ação antioxidante. Quando comparados os resultados de Peixoto et al. (2017) com os resultados encontrados no presente estudo a atividade dos extratos obtidos a partir do bagaço de uva apresentaram uma atividade antioxidantes ainda maior, demonstrando uma boa relação entre o resíduo e a capacidade antioxidante do extrato.

Neste sentido, pode ser observada a interessante atividade antioxidante do bagaço de uva em diferentes estudos, a influência do método de extração aplicado e do ensaio utilizado, assim como da composição da matéria-prima.

4.2.2 Atividade antimicrobiana

Os resultados obtidos nos ensaios de atividade antimicrobiana (antibacteriana e antifúngica) dos extratos hidroetanólicos obtidos a partir do bagaço de uva, avaliados em diferentes métodos de extração, estão presentes na **Tabela 4**.

Para as análises foram utilizadas três bactérias patogênicas Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes*) e três Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* e *Salmonella Typhimurium*) e seis fungos (*Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus niger*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium aurantiogriseum*, *Trichoderma viride*).

No geral, os resultados obtidos evidenciaram a capacidade antibacteriana frente às estirpes estudadas. Em relação às bactérias Gram-negativas a *Escherichia coli* (*E.c*) e a *Salmonella Typhimurium* (*S.t*) apresentaram valores de CMI (inibição de 50% das bactérias) de 1 mg/mL e CMB (concentração mínima bactericida) de 2 mg/mL para todos os extratos. A estirpe *Enterobacter cloacae* (*En.cl*) mostrou-se mais sensível para todos os extratos analisados com os valores de CMI de 0,25 mg/mL; 0,5 mg/mL e 1 mg/mL (EM, EAU, EAM, respetivamente) e CMB de 0,5 mg/mL; 1 mg/mL e 2 mg/mL para os extratos obtidos por EM, EAU e EAM, respetivamente. Foi possível observar que, de todos os extratos avaliados, o extrato obtido por EM apresentou um melhor desempenho

bactericida e bacteriostático, e a *En.cl.* foi a estirpe mais suscetível. As bactérias patogênicas Gram-positivas *Staphylococcus áureos* (*S.a*) e *Listeria monocytogenes* (*L.m.*) apresentaram valores de CMI de 1 mg/mL e CMB de 2 mg/mL em relação aos três extratos analisados. *Bacillus cereus* (*B.c.*) foi a estirpe mais suscetível a capacidade inibitória e bactericida do extrato obtido por EAU, com CMI de 0,25 mg/mL e CMB de 0,5 mg/mL, quando comparados com os demais extratos.

Quando analisados os resultados da atividade antimicrobiana dos extratos e comparados com os conservantes utilizados como controlo positivo, o *Bacillus cereus* foi mais sensível ao extrato obtido por EAU com CMI de 0,25 mg/mL do que para os conservantes E211 e E224 (CMI de 0,5 mg/mL e 2 mg/mL, respetivamente), e o extrato obtido por EM apresentou melhor atividade (CMI de 0,25 mg/mL) para o *Enterobacter cloacae* do que os conservantes E211 e E224 (CMI de 2 mg/mL).

Em relação à avaliação do potencial antifúngico, todos os extratos apresentaram valores satisfatórios fungicidas (CMI) e fungistáticos (CMF). Os extratos obtidos por EM apresentaram valores de CMI e CMF de 0,5 e 0,1 mg/mL, respetivamente, para as espécies *Aspergillus ochraceus* (*A.o*), *Aspergillus versicolor* (*A.v*) e *Penicillium funiculosum* (*P.f*). As estirpes mais suscetíveis ao extrato obtido por EM foram *Aspergillus niger* (*A.n*), *Penicillium aurantiogriseum* (*P.a*) e *Trichoderma víride* (*T.v*) com valores de CMI de 0,25 mg/mL e CMF de 0,5 mg/mL. Relativamente ao extrato obtido por EAM a estirpe *Trichoderma víride* (*T.v*) foi mais suscetível com CMI de 0,25 mg/mL e CMF de 0,5 mg/mL. O extrato obtido por EAU apresentou melhores resultados com valores de CMI 0,25 mg/mL para *Aspergillus niger* (*A.n*), *Penicillium funiculosum* (*P.f*) *Penicillium aurantiogriseum* (*P.a*) e *Trichoderma víride* (*T.v*) e 0,5 mg/mL para os demais fungos e CMF de 0,5 mg/mL para todas as estirpes analisadas.

Tabela 4: Atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos hidroetanólicos obtidos a partir do bagaço de uva em diferentes métodos de extração

		Atividade Antibacteriana					
		<i>S.a.</i>	<i>B.c.</i>	<i>L.m.</i>	<i>E.c.</i>	<i>S.t.</i>	<i>En.cl.</i>
Extrato obtido por maceração	CMI	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,25
	CMB	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	0,5
	CMI	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

Extrato obtido por micro-ondas	CMB	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Extrato obtido por ultrassons	CMI	1,00	0,25	1,00	1,00	1,00	0,5
	CMB	2,00	0,5	2,00	2,00	2,00	1,00
E211	CMI	4,00	0,50	1,00	1,00	1,00	2,00
	CMB	4,00	0,50	2,00	2,00	2,00	4,00
E224	CMI	1,00	2,00	0,50	0,50	1,00	2,00
	CMB	1,00	4,00	1,00	1,00	1,00	4,00
Atividade Antifúngica							
Extrato		<i>A.o.</i>	<i>A.n.</i>	<i>A.v.</i>	<i>P.f.</i>	<i>P.a.</i>	<i>T.v.</i>
Extrato obtido por maceração	CMI	0,5	0,25	0,5	0,5	0,25	0,25
	CMF	1,00	0,5	1,00	1,00	0,5	0,5
Extrato obtido por micro-ondas	CMI	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25
	CMF	1,00	0,5	0,5	1,00	1,00	0,5
Extrato obtido por ultrassons	CMI	0,5	0,25	0,5	0,25	0,25	0,25
	CMF	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
E211	CMI	1,00	1,00	2,00	1,00	2,00	1,00
	CMF	2,00	2,00	2,00	2,00	4,00	2,00
E224	CMI	1,00	1,00	1,00	0,50	1,00	0,50
	CMF	1,00	1,00	1,00	0,50	1,00	0,50

Extrato obtidos por EM- Extrato obtido por maceração; Extrato obtido por EAM- Extrato obtido por extração assistida por micro-ondas; Extrato obtido por EAU- Extrato obtido por extração assistida por ultrassons. *S.a.*: *Staphylococcus aureus*; *B.c.*: *Bacillus cereus*; *L.m.*: *Listeria monocytogenes*; *E.c.*: *Escherichia coli*; *S.t.*: *Salmonella Typhimurium*; *En.cl.*: *Enterobacter cloacae*; *A.o.*: *Aspergillus ochraceus*; *A.n.*: *Aspergillus niger*; *A.v.*: *Aspergillus versicolor*; *P.f.*: *Penicillium funiculosum*; *P.a.*: *Penicillium aurantiogriseum*; *T.v.*: *Trichoderma viride*. CMI: concentração mínima inibitória, CMB: concentração mínima bactericida; CMF: concentração mínima fungicida. (Benzoato de sódio-E211 e Metabissulfito de potássio-E224)

Existem vários estudos disponíveis na literatura que evidenciam o potencial antimicrobiano do bagaço de uva.

O bagaço de uva apresenta resultados que podem variar de acordo com o cultivar, método de extração, concentração do extrato e a composição fenólica (Özkan et al., 2004).

Isso pode ser evidenciado no estudo realizado por Silva et al. (2018) que ao avaliarem a atividade antimicrobiana dos extratos das cascas, sementes e caules obtidos de subprodutos vinícolas de duas variedades de uva, os resultados comprovaram a eficácia dos extratos para todas as estirpes gram-positivas (*Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*). Porém para as bactérias gram-negativas (*Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) não apresentaram inibição da atividade antibacteriana.

Xu et al. (2015) também avaliou as bactérias Gram-positivas (*Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*) e Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*) do extrato do bagaço de uva de quatro variedades de uvas cultivadas na Virginia. Os resultados mostraram que os extratos não apresentaram atividade antimicrobiana para as culturas gram-negativas, o que diverge dos resultados encontrados no presente trabalho onde os extratos do bagaço de uva apresentaram resultados positivos frente as bactérias patógenas Gram-negativas analisadas.

Por outro lado, Özkan et al. (2004) avaliaram os efeitos antibacterianos de diferentes concentrações (1, 2,5, 5, 10 e 20%) de extrato de bagaço de uva contra 14 bactérias, entre elas as Gram-positivas: *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e as Gram-negativas: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, que também foram avaliadas no presente estudo. E os resultados revelaram que apenas a concentração de 1% não apresentou inibição antibacteriana. O que comprova a eficácia do extrato de bagaço de uva frente as bactérias Gram-negativas, resultados que também foram encontrados nesse estudo.

Em relação a atividade antifúngica não são encontrados muitos trabalhos na literatura que analisem este tipo de amostragem. Destaca-se apenas Yadav et al. (2015) que avaliaram a atividade antifúngica de extratos da casca de uva preta em diferentes solventes de extração, nas estirpes de fungos *Aspergillusniger* e *Aspergillusversicolor*. Os resultados mostraram semelhança com o presente estudo, quanto ao potencial inibitório.

4.2.3 Avaliação da citotoxicidade e hepatotóxica

Os resultados obtidos nos ensaios de citotoxicidade e hepatotoxicidade estão representados na **Tabela 5**. Este estudo mostrou que nem todos os extratos testados têm capacidade antiproliferativa em todas as linhas celulares tumorais usadas.

O extrato obtido por EM apresentou capacidade antiproliferativa nas linhas celulares tumorais AGS, MCF-7 e NCI-H460 e o maior potencial inibitório foi encontrado na linha tumoral NCI-H460 com um valor de GI_{50} de $201 \pm 17 \mu\text{g/mL}$. De outro modo, no extrato obtido por EAM apenas a linha celular tumoral AGS apresentou capacidade antiproliferativa com o valor de GI_{50} de $285 \pm 19 \mu\text{g/mL}$. O extrato que apresentou potencial inibitório ($< 400 \mu\text{g/mL}$) em todas as linhas avaliadas foi obtido por EAM, observando-se maior capacidade antiproliferativa na linha celular NCI-H460 (GI_{50} de $166 \pm 6 \mu\text{g/mL}$).

Após a aplicação do tratamento estatístico, os extratos obtidos por EM e EAU não apresentam diferenças significativas entre eles ($p < 0,05$) nas linhas celulares tumorais em que ambos apresentam potencial inibitório ($< 400 \mu\text{g/mL}$). Nesse sentido, os extratos obtidos por EM e EAU apresentaram os melhores resultados nas linhas tumorais AGS, MCF-7 e NCI-H460.

Em relação ao ensaio de toxicidade, avaliado através de uma cultura de células primárias não-tumorais (PLP2), provou-se que os extratos obtidos a partir das extrações por EM e EAM não possuem toxicidade até a concentração testada de $400 \mu\text{g/mL}$.

Relativamente aos resultados da atividade anti-inflamatória, presentes na **Tabela 5**, foi possível constatar que não houve atividade por parte de nenhum dos extratos testados, ou seja, não foi detectado potencial anti-inflamatório até a concentração máxima testada de $400 \mu\text{g/mL}$ nos diferentes extratos de bagaço de uva.

Tabela 5: Atividade citotóxica e anti-inflamatória dos extratos hidroetanólicos obtidos a partir do bagaço de uva em diferentes métodos de extração

Atividade Citotóxica				
GI₅₀ (µg/mL)	Extrato obtido por maceração	Extrato obtido por micro-ondas	Extrato obtido por ultrassons	p- value
AGS	209±3 ^a	285±19 ^b	211±2 ^a	<0,01
CaCo2	> 400	> 400	265±19	-
MCF 7	312±4	> 400	287±27	0,13
NCI-H460	201±17	> 400	166±7	0,11
PLP2	> 400	> 400	323±32	-
Atividade Anti-inflamatória				
RAW264,7	> 400	> 400	> 400	

AGS: adenocarcinoma gástrico; CaCo2: adenomacarcinoma colorretal; MCF7: carcinoma da mama; NCI-H460: carcinoma de pulmão; PLP2: cultura primária de fígado de porco; RAW 264,7: células macrófagas de rato. Em cada linha, para cada tipo de extração (maceração, micro-ondas, ultrassons) letras diferentes significam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Costa et al. (2019) analisaram a citotoxicidade do bagaço de uva *Vitis vinifera* L. cv. *Syrah* em concentrações de 1 e 2% (p/v) obtidos por extração enzimática. A toxicidade foi avaliada através do ensaio XTT em células intestinais de Caco2 antes e após a ingestão. O extrato promoveu o metabolismo das células Caco2 antes da ingestão, e após a ingestão as células de Caco2 apresentaram uma leve, mas não significativa inibição do metabolismo. Esses autores puderam concluir que em concentrações de até 2% o bagaço de uva é seguro para utilização como ingrediente alimentar.

Também a citotoxicidade do bagaço de uva *Vitis vinifera* L. (peles, semente e mistura) obtidos a partir da extração por maceração foi analisada por Peixoto et al. (2018). As linhagens celulares avaliadas foram: MCF-7, NCI-H460 e a cultura de células não tumoral PLP2. Para MCF-7 as sementes e a mistura inibiram o seu crescimento com valores de $GI_{50} = 352 \mu\text{g/mL}$ e $GI_{50} = 332 \mu\text{g/mL}$ respectivamente, mas não apresentaram efeitos citotóxicos na linhagem NCI-H460. E em relação a célula não tumoral PLP2 nenhum dos extratos apresentaram toxicidade.

Relativamente à atividade anti-inflamatória, até à presente data não foram encontrados estudos que avaliem a atividade anti-inflamatória dos referidos extratos em células macrófagas RAW 264.7 de rato. Nos estudos encontrados Martins et al. (2016) avaliaram a atividade anti-inflamatória do bagaço de uva (GP) tratados com *Paecilomyces*

variotii tanase (GPTNS), analisando se os seus constituintes apresentavam diminuição da inflamação em células Caco-2 quando comparados com o bagaço de uva não tratado, os resultados obtidos revelam que tanto o GP quanto o GPTNS atenuaram as respostas inflamatórias induzidas por IL-1b em células Caco-2 e o tratamento com tanase aumentou essas ações.

Trikas et al. (2016) avaliaram e compararam a atividade anti-inflamatória das antocianinas extraídas do bagaço com a variedade de vinho (Syrah) a partir da qual os subprodutos específicos foram produzidos. Os resultados mostraram que o bagaço reduziu a atividade da COX-1 em 99% e COX-2 em 89,1% na mesma concentração com o vinho tinto (100 100 μ M de TAC).

Os dois estudos apresentados que avaliaram a atividade anti-inflamatória em bagaço de uva obtiveram resultados positivos frente as células analisadas. Podendo concluir que em determinadas células o bagaço de uva apresenta atividade anti-inflamatória. Esta discrepância de resultados pode ser explicada devido à diversidade da amostragem, ou seja, variedade da uva usada para o processamento do vinho, assim como, estado de maturação e divergência percentual de cascas, talos e sementes.

4.3 Estudo de incorporação do extrato rico em compostos fenólicos, obtidos a partir do bagaço de uva em *wraps*

4.3.1 Avaliação da carga microbiana

O estudo de incorporação foi realizado usando o extrato com maior concentração de compostos fenólicos, assim como, melhor potencial bioativo, levando à aplicação do extrato do bagaço de uva obtido a partir da EM.

A carga microbiana foi avaliada através da análise de inibição do crescimento de diferentes microrganismos e observação do seu crescimento ao longo do tempo de armazenamento. Foram analisadas, nas três amostragens (controle, aditivo sintético e ingrediente natural), mesófilos aeróbios totais, coliformes, bolores e leveduras no período de armazenamento de 0, 3 e 7 dias após a sua preparação. Os resultados estão representados em forma de gráficos, com os respectivos desvios padrões, na **Figura 11**.

Em relação aos mesófilos totais, foi possível observar que o crescimento dos microrganismos nos *wraps* que tinham a adição do aditivo artificial apresentou os

melhores resultados, e nos *wraps* com adição do extrato até o terceiro dia diminuíram significativamente o crescimento quando comparado com controlo. No caso das leveduras foi observado um crescimento significativo no terceiro dia em todas as amostras e um comportamento inesperado na análise nos *wraps* com aditivo, apresentando um elevado crescimento quando comparado com as demais amostras. Nos *wraps* com adição do extrato o crescimento de leveduras foi significativamente menor apenas no sétimo dia de armazenamento quando comparado com o controlo. No que concerne aos bolores e coliformes não foi observado o crescimento significativo em nenhum dos *wraps* analisados ao longo dos 7 dias de armazenamento.

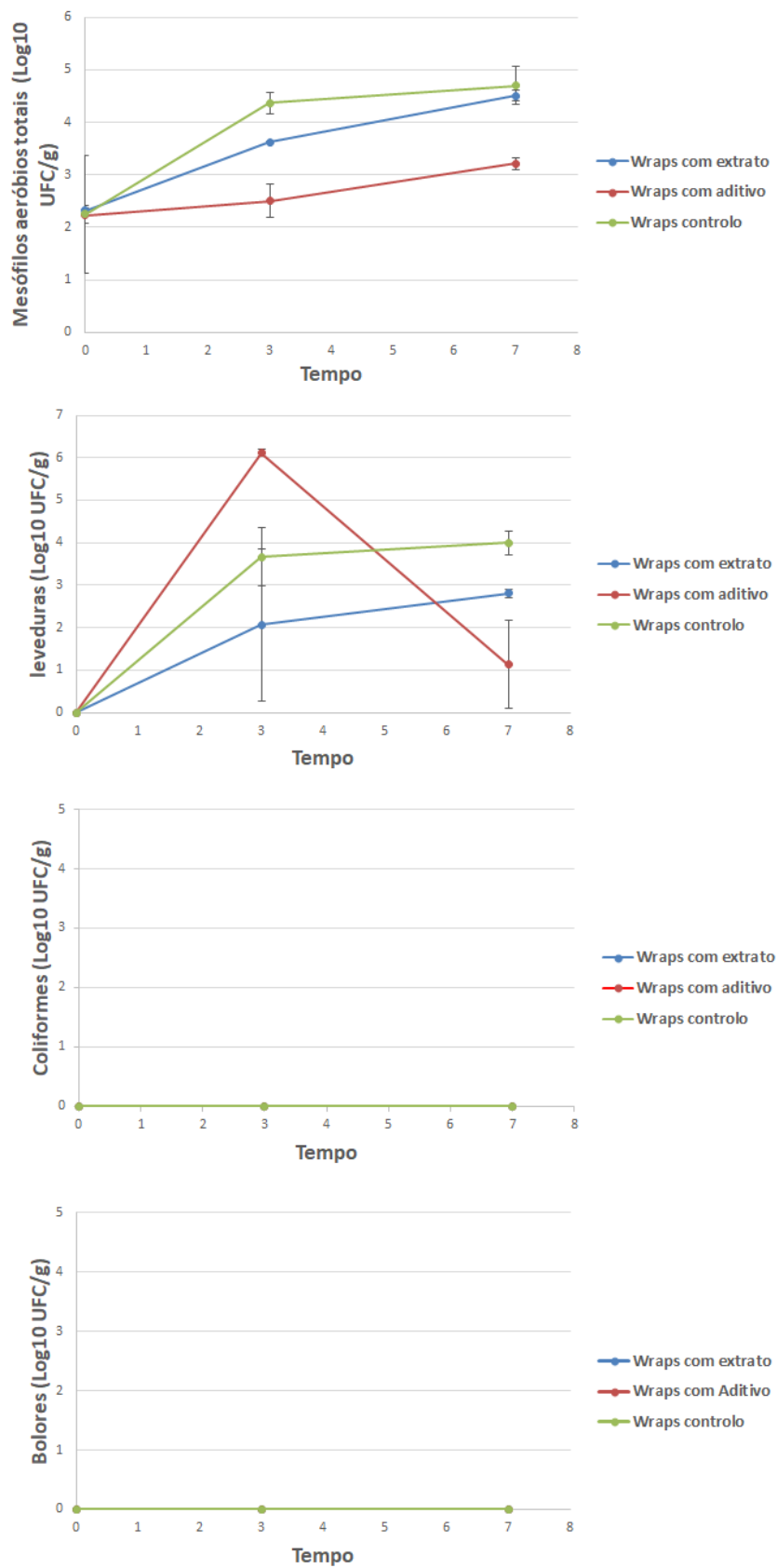


Figura 11: Gráficos do crescimento microbiano.
(Fonte: do autor, (2022))

Sagdic et al. (2011) avaliaram o extrato de cinco variedades bagaço de uva em diferentes concentrações (1, 2, 5 e 10%) em hambúrgueres bovinos, observando o crescimento microbiano após um período de armazenamento de 0, 12, 24 e 48 horas. Os resultados apresentaram uma inibição de todos os microrganismos avaliados na concentração de 10%. E os patógenos Enterobacteriaceae e bactérias coliformes, e os microrganismos deteriorantes, incluindo leveduras, bolores e bactérias lipolíticas, também foram inibidos na concentração de 5% em 3 variedades do extrato de bagaço de uva. Os extratos que apresentaram maior atividade de eliminação de radicais e maior quantidade de compostos fenólicos apresentaram melhores resultados.

Zaky et al. (2020) avaliaram a utilização de diferentes concentrações do extrato de bagaço de uva (0,5%, 1%, 2% e 3%) como fonte antioxidante natural em biscoitos. Foram realizados testes físico-químicos e sensoriais para avaliar a qualidade dos biscoitos produzidos. Os resultados mostraram que o uso do extrato de bagaço de uva melhorou a atividade antioxidante, o teor de fenólicos totais e a cor dos biscoitos. Além disso, a adição 2% de extrato de bagaço de uva melhorou a estabilidade oxidativa e aumentou a vida útil dos biscoitos.

Os estudos apresentados acima ressaltam que a variedade, a concentração dos extratos de bagaço, assim como a quantidade de compostos fenólicos influenciam significativamente na eficácia antimicrobiana e antioxidante quando adicionados em formulações alimentícias. Os demais estudos encontrados na literatura, que utilizaram o bagaço de uva em produtos de panificação, em sua maioria é na forma de farinha para melhorar a características nutricionais, aumentando a percentagem de fibras, e como possível agente antioxidante, retardando as reações oxidativas e conservando-os por mais tempo.

5 Considerações finais

A atual necessidade da diminuição dos impactos gerados pela grande produção de resíduos das indústrias alimentares, assim como a busca por alternativas mais saudáveis que mantenham as características e necessidades disponibilizadas pelos aditivos artificiais, foram fatores que contribuíram a escolha do tema desta dissertação.

Sabe-se que as propriedades farmacológicas, tecnológicas, antioxidantes e antimicrobianas estão diretamente ligadas aos compostos fenólicos presentes no bagaço de uva e a sua concentração está relacionada com diversos fatores, nomeadamente a variedade da uva, estágio de maturação, tecnologia de extração aplicada, condições de armazenamento, processamento e cultivo.

Neste sentido, o presente estudo levou a cabo a caracterização dos resíduos obtidos na transformação da uva em vinho, designado de bagaço de uva, avaliando três diferentes métodos de extração (EM, EAU e EAM) quanto à influência nas concentrações de compostos fenólicos e nas propriedades bioativas do bagaço de uva.

Os extratos dos resíduos do bagaço de uva obtidos pelos três métodos de extração apresentaram diferentes concentrações de compostos fenólicos, tendo sido identificados ácidos fenólicos, taninos, flavonoides e estilbenos. A pentâmero de procianidina foi o composto fenólico com maior concentração nos três extratos analisados. Em relação às propriedades bioativas do bagaço de uva, destacou-se a sua atividade antioxidante e antimicrobiana.

O extrato obtido por ME foi, claramente, o extrato mais promissor, tendo sido o escolhido para os estudos de incorporação em *wraps*. Através da análise da carga microbiana, verificou-se uma redução do crescimento de mesófilos totais até ao terceiro dia de armazenamento quando comparado com a amostra controlo.

Desde forma, o estudo permitiu verificar que o bagaço de uva pode ser considerado uma fonte de compostos fenólicos, com propriedades conservantes, capaz de substituir de forma eficaz os seus análogos sintéticos.

Relativamente às perspetivas futuras, novas análises serão desenvolvidas com o aumento da concentração do extrato em *wraps*, com o intuito de avaliar se ao longo do tempo com o aumento da concentração de extrato, ocorre uma diminuição do crescimento microbiano. E análises nutricionais e físico-químicas a fim de verificar alterações do comportamento e características do alimento após a adição do extrato.

6 Referências bibliográficas

- Aires, M. V. L., Modesto, R. M. G., & Santos, J. S. (2021). The benefits of grape on human health: a review. *Research, Society and Development*, 10(14), e281101421825. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i14.21825>.
- Alexandru, L., Binello, A., Mantegna, S., Boffa, L., Chemat, F., & Cravotto, G. (2014). Efficient green extraction of polyphenols from post-harvested agro-industry vegetal sources in Piedmont. *Comptes Rendus Chimie*, 17(3), 212–217.
- Alvi, T., Asif, Z., & Iqbal Khan, M. K. (2022). Clean label extraction of bioactive compounds from food waste through microwave-assisted extraction technique-A Review. *Food Bioscience*, 46, 101580. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101580>.
- Amicarelli, V., & Bux, C. (2020). Food waste measurement toward a fair, healthy and environmental-friendly food system: A critical review. *British Food Journal*, 123(8), 2907–2935. <https://doi.org/10.1108/bfj-07-2020-0658>.
- Antoniolli, A., Fontana, A., R., Piccoli, P., & Bottini, R. (2015). Characterization of Polyphenols and Evaluation of Antioxidant Capacity in Grape Pomace of the CV. Malbec. *Food Chemistry*, vol. 178, pp. 172–178. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.082>.
- Arboleda Mejia, J.A.; Ricci, A., Figueiredo, A.S., Versari, A., Cassano, A., Parpinello, G.P., & De Pinho, M.N. (2020) Recovery of Phenolic Compounds from Red Grape Pomace Extract through Nanofiltration Membranes. *Foods*, vol. 9, no. 11, p. 1649. <https://doi.org/10.3390/foods9111649>.
- Arbos, K. A., Stevani, P. C., & Castanha, R. de. (2013). Atividade antimicrobiana, antioxidante e teor de compostos fenólicos em casca e amêndoa de frutos de manga. *Revista Ceres*, 60(2), 161–165. <https://doi.org/10.1590/s0034-737x2013000200003>.
- Ballard, C. R., & Maróstica, M. R. (2019). Health Benefits of Flavonoids. *Bioactive Compounds*, 185–201. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814774-0.00010-4>.
- Bandar, H., Hijazi, A., Rammal, H., Hachem, A., Saad, Z., & Badran, B. (2013). Techniques for the Extraction of Bioactive Compounds from Lebanese *Urtica dioica*. *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*. 16, 507-513.

- Barba, F. J., Zhu, Z., Koubaa, M., Sant'Ana, A. S., & Orlien, V. (2016). Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 49, 96–109. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.01.006>.
- Barros, L., Pereira, E., Calhelha, R. C., Dueñas, M., Carvalho, A. M., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). Bioactivity and chemical characterization in hydrophilic and lipophilic compounds of *Chenopodium ambrosioides* L. *Journal of Functional Foods*, 5(4), 1732–1740. doi: 10.1016/j.jff.2013.07.019.
- Barros, R. G., Andrade, J. K., Denadai, M., Nunes, M. L., & Narain, N. (2017). Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity in some Brazilian exotic fruit residues. *Food Research International*, 102, 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.082>.
- Becker, P., P., Teixeira, B., M., Jacques, A., C., & Zambiasi, R., C. (2010). Determinação de ácido ascórbico e tocoferóis em frutas por CLAE. *Semana: Ciências Agrárias*, 31(2), 381-389. Disponível em: <<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=445744096011>>. Acesso em: 09 de junho de 2022.
- Bender, A. B., Luvielmo, M. de, Loureiro, B. B., Speroni, C. S., Boligon, A. A., Silva, L. P., & Penna, N. G. (2016). Obtenção e Caracterização de Farinha de Casca de Uva e sua utilização em snack extrusado. *Brazilian Journal of Food Technology*, 19. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.1016>.
- Beres, C., Costa, G. N. S., Cabezudo, I., da Silva-James, N. K., Teles, A. S. C., Cruz, A. P. G., Mellinger-Silva, C., Tonon, R. V., Cabral, L. M. C., & Freitas, S. P. (2017). Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: A Review. *Waste Management*, 68, 581–594. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.07.017>.
- Bondam, A. F., Diolinda da Silveira, D., Pozzada dos Santos, J., & Hoffmann, J. F. (2022). Phenolic compounds from coffee by-products: Extraction and application in the food and pharmaceutical industries. *Trends in Food Science & Technology*, 123, 172-186. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.03.013>.
- Bordiga, M., Travaglia, F., & Locatelli, M. (2019). Valorisation of grape pomace: An approach that is increasingly reaching its maturity - a review. *International Journal of Food Science & Technology*, 54(4), 933–942. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14118>

- Caetano, A. C., Melo, E., Lima, V. L., Maciel, M. I., & Araújo, C. (2009). Extração de Antioxidantes de resíduos Agroindustriais de Acerola. *Brazilian Journal Of Food Technology*, 12(02), 155–160. <https://doi.org/10.4260/bjft2009800900006>.
- Cecchi, L., Innocenti, M., Urciuoli, S., Arlorio, M., Paoli, P., & Mulinacci, N. (2019). In depth study of phenolic profile and PTP-1B inhibitory power of cold-pressed grape seed oils of different varieties. *Food Chemistry*, 271, 380–387. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.140>.
- Chamorro, F., Carpena, M., Fraga-Corral, M., Echave, J., Riaz Rajoka, M. S., Barba, F. J., Cao, H., Xiao, J., Prieto, M. A., & Simal-Gandara, J. (2022). Valorization of Kiwi Agricultural Waste and industry by-products by recovering bioactive compounds and applications as food additives: A circular economy model. *Food Chemistry*, 370, 131315. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131315>.
- Chaouch, M. A., & Benvenuti, S. (2020). The role of fruit by-products as bioactive compounds for intestinal health. *Foods*, 9(11), 1716. <https://doi.org/10.3390/foods9111716>.
- Chedea, V.S., Macovei, Ș.O., Bocșan, I.C., Măgureanu, D.C., Levai, A.M., Buzoianu, A.D., & Pop, R.M. (2022). Grape Pomace Polyphenols as a Source of Compounds for Management of Oxidative Stress and Inflammation—a Possible Alternative for Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs? *Molecules*, vol. 27, no. 20, p. 6826. <https://doi.org/10.3390/molecules27206826>.
- Chmiel, M., & Stompor-Goraçy, M. (2022). The Spectrum of Pharmacological Actions of Syringetin and Its Natural Derivatives—A Summary Review. *Nutrients*, 14(23), 5157. <https://doi.org/10.3390/nu14235157>.
- Ciğeroğlu, Z., Bayramoğlu, M., Kırbaşlar, Ş. İ., & Şahin, S. (2020). Comparison of microwave-assisted techniques for the extraction of antioxidants from Citrus Paradisi Macf. Biowastes. *Journal of Food Science and Technology*, 58(3), 1190–1198. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04632-x>.
- Costa, J. R., Amorim, M., Vilas Boas, A., Tonon, R. V., Cabral, L. M.C., Pastrana, L., & Pintado, M. (2019). “Impact of *in Vitro* Gastrointestinal Digestion on the Chemical Composition, Bioactive Properties, and Cytotoxicity of *Vitis Vinifera* L. Cv. Syrah Grape Pomace Extract.” *Food & Function*, vol. 10, no. 4, pp. 1856–1869. <https://doi.org/10.1039/c8fo02534g>.

- De Camargo, A. C., Schwember, A. R., Parada, R., Garcia, S., Maróstica, M. R., Franchin, M., Regitano-d'Arce, M. A., & Shahidi, F. (2018). Opinion on the hurdles and potential health benefits in value-added use of plant food processing by-products as sources of phenolic compounds. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(11), 3498. <https://doi.org/10.3390/ijms19113498>.
- Decreto lei n.º 73/2011, 17 de junho do Ministério do Ambiente e do Ordenamento do Território, Diário da República n.º 116/2011, Série I de 2011-06-17, páginas 3251 – 3300. Obtido em 03 de maio de 2022. Retrieved from: <https://dre.pt/dre/detalhe/decreto-lei/73-2011-670034>.
- Deng, G.-F., Shen, C., Xu, X.-R., Kuang, R.-D., Guo, Y.-J., Zeng, L.-S., Gao, L.-L., Lin, X., Xie, J.-F., Xia, E.-Q., Li, S., Wu, S., Chen, F., Ling, W.-H., & Li, H.-B. (2012). Potential of fruit wastes as natural resources of bioactive compounds. *International Journal of Molecular Sciences*, *13*(7), 8308–8323. <https://doi.org/10.3390/ijms13078308>.
- Dini, I. (2021). Bio discarded from waste to resource. *Foods*, *10*(11), 2652. <https://doi.org/10.3390/foods10112652>.
- Drevelegka, I., & Goula, A. M. (2020). Recovery of Grape Pomace Phenolic Compounds through Optimized Extraction and Adsorption Processes. *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification*, vol. 149, p. 107845., <https://doi.org/10.1016/j.cep.2020.107845>.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (2013). O desperdício alimentar tem consequências ao nível do clima, da água, da terra e da biodiversidade. Obtido em 1 de Outubro de 2022. Retrieved from: <https://www.fao.org/news/story/pt/item/204029/icode/>.
- FAO, 2019. FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/FBS>. Obtido em 08 de Maio 2022.
- Fernandes, F., Pereira, E., Prieto, M. A., Calhelha, R. C., Ćirić, A., Soković, M., Simal-Gandara, J., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2019). Optimization of the extraction process to obtain a colorant ingredient from leaves of *Ocimum basilicum* var. *purpurascens*. *Molecules*, *24*(4), 686. doi:10.3390/molecules24040686.

- Ferreira, L. F. D. Obtenção e caracterização de farinha de bagaço de uva e sua utilização em cereais matinais expandidos. (2010). [Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa]. <https://www.locus.ufv.br/handle/123456789/428>.
- Ferri, M., Rondini, G., Calabretta, M. M., Michelini, E., Vallini, V., Fava, F., Roda, A., Minnucci, G., & Tassoni, A. (2017). “White Grape Pomace Extracts, Obtained by a Sequential Enzymatic plus Ethanol-Based Extraction, Exert Antioxidant, Anti-Tyrosinase and Anti-Inflammatory Activities.” *New Biotechnology*, vol. 39, 2017, pp. 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.07.002>.
- Garrido, T., Gizdavic-Nikolaidis, M., Leceta, I., Urdanpilleta, M., Guerrero, P., de la Caba, K., & Kilmartin, P. A. (2019). Optimizing the Extraction Process of Natural Antioxidants from Chardonnay Grape Marc Using Microwave-Assisted Extraction. *Waste Management*, vol. 88, 2019, pp. 110–117. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.03.031>.
- Gomez, L., Tiwari, B., & Garcia-Vaquero, M. (2020). Emerging extraction techniques: Microwave-assisted extraction. *Sustainable Seaweed Technologies*, 207–224. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-817943-7.00008-1>.
- González, M., Barrios, S., Budelli, E., Pérez, N., Lema, P., & Heinzen, H. (2020). Ultrasound assisted extraction of bioactive compounds in fresh and freeze-dried vitis vinifera CV tannat grape pomace. *Food and Bioproducts Processing*, 124, 378–386. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.09.012>.
- Goula, A. M., Thymiatis, K., & Kaderides, K. (2016). Valorization of Grape Pomace: Drying Behavior and Ultrasound Extraction of Phenolics. *Food and Bioproducts Processing*, vol. 100, pp. 132–144. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2016.06.016>.
- Guimarães, R., Barros, L., Dueñas, M., Calhella, R. C., Carvalho, A. M., Santos-Buelga, C., Queiroz, M. J. R. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). Infusion and decoction of wild German chamomile: Bioactivity and characterization of organic acids and phenolic compounds. *Food Chemistry*, 136(2), 947–954. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.09.007.
- Iqbal, A., Schulz, P., & Rizvi, S. S. H. (2021). Valorization of bioactive compounds in fruit pomace from agro-fruit industries: Present insights and future challenges. *Food Bioscience*, 44, 101384. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101384>.

- Jabeur, I., Tobaldini, F., Martins, N., Barros, L., Martins, I., Calhelha, R. C., Henriques, M., Silva, S., Achour, L., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2016). Bioactive properties and functional constituents of *Hypericum androsaemum* L.: A focus on the phenolic profile. *Food Research International*, *89*, 422–431. doi: 10.1016/j.foodres.2016.08.040.
- Kumar, K., Yadav, A. N., Kumar, V., Vyas, P., & Dhaliwal, H. S. (2017). Food waste: A potential bioresource for extraction of nutraceuticals and bioactive compounds. *Bioresources and Bioprocessing*, *4*(1). <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0148-6>.
- Kumar, N., & Goel, N. (2019). Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnology Reports*, *24*. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00370>.
- Lockowandt, L., Pinela, J., Roriz, C. L., Pereira, C., Abreu, R. M. V., Calhelha, R. C., Alves, M. J., Barros, L., Bredol, M., & Ferreira, I. C. F. R. (2019). Chemical features and bioactivities of cornflower (*Centaurea cyanus* L.) capitula: The blue flowers and the unexplored non-edible part. *Industrial Crops and Products*, *128*, 496–503. doi: 10.1016/j.indcrop.2018.11.059.
- Lopes, M. F. (2015). Compostos Bioativos E Capacidade Antioxidante Em Blends Em Pó De Frutas E Hortaliças Obtidos Por Atomização [Master's thesis, Universidade Federal de João Pessoa]. Disponível em: <chrome-extension://efaidnbnmnnibpcajpcgclclefindmkaj/http://dspace.sti.ufcg.edu.br:8080/jspui/bitstream/riufcg/893/1/MA%C3%8DRA%20FELINTO%20LOPES%20%E2%80%93%20TESE%20%28PPGEP%29%202015.pdf>. Acesso em: 09 mai. 2022.
- Majumder, P., & Annegowda, H. V. (2021). Chapter 7 - Fruit and vegetable by-products: novel ingredients for a sustainable society. In R. Bhat (Ed.), *Valorization of Agri-Food Wastes and By-Products* (pp. 133-156): Academic Press.
- Marques, T. R., Caetano, A. A., Rodrigues, L. M., Simao, A. A., Machado, G. H., & Correa, A. D. (2017). Characterization of phenolic compounds, antioxidant and antibacterial potential the extract of acerola bagasse flour. *Acta Scientiarum. Technology*, *39*(2), 143. <https://doi.org/10.4025/actascitechnol.v39i2.28410>.
- Martins, I. M., Mecedo, G. A., Macedo, J. A., Roberto, B. S., Chen, Q., Blumberg, J. B., & Chen, C. O. (2017). Tannase Enhances the Anti-Inflammatory Effect of Grape

- Pomace in Caco-2 Cells Treated with Il-1 β . *Journal of Functional Foods*, vol. 29, pp. 69–76., <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.12.011>.
- Montagner, G. E., Ribeiro, M. F., Cadoná, F. C., Franco, C., & Gomes, P. (2022). Liposomes loading grape seed extract: A nanotechnological solution to reduce wine-making waste and obtain health-promoting products. *Future Foods*, 5, 100144. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2022.100144>.
- Monteiro, G. C., Minatel, I. O., Junior, A. P., Gomez-Gomez, H. A., de Camargo, J. P., Diamante, M. S., Pereira Basílio, L. S., Tecchio, M. A., & Pereira Lima, G. P. (2021). Bioactive compounds and antioxidant capacity of grape pomace flours. *LWT*, 135, 110053. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110053>.
- Moro, K. I. B., Bender, A. B. B., da Silva, L.P. & Penna, N. G. (2021) Green Extraction Methods and Microencapsulation Technologies of Phenolic Compounds From Grape Pomace: A Review. *Food Bioprocess Technol* 14, 1407–1431. <https://doi.org/10.1007/s11947-021-02665-4>.
- Moro, K. I., Bender, A. B., Ferreira, D. de, Speroni, C. S., Barin, J. S., da Silva, L. P., & Penna, N. G. (2021). Recovery of phenolic compounds from grape pomace (*vitis vinifera* L.) by microwave hydrodiffusion and gravity. *LWT*, 150, 112066. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112066>.
- Murray, A., Skene, K., & Haynes, K. (2015). The circular economy: An interdisciplinary exploration of the concept and application in a global context. *Journal of Business Ethics*, 140(3), 369–380. <https://doi.org/10.1007/s10551-015-2693-2>.
- Narváez-Cuenca, C.-E., Inampues-Charfuelan, M.-L., Hurtado-Benavides, A.-M., Parada-Alfonso, F., & Vincken, J.-P. (2020). The phenolic compounds, tocopherols, and phytosterols in the edible oil of guava (*psidium guava*) seeds obtained by supercritical CO₂ Extraction. *Journal of Food Composition and Analysis*, 89, 103467. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103467>.
- Nayak, A., Bhushan, B., Rosales, A., Turienzo, L. R., & Cortina, J. L. (2018). Valorisation potential of cabernet grape pomace for the recovery of polyphenols: Process intensification, optimisation and study of Kinetics. *Food and Bioprocess Processing*, 109, 74–85. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.03.004>.

- Negro, C., Tommasi, L., & Micali, A. (2003). Phenolic Compounds and Antioxidant Activity from Red Grape Marc Extracts. *Bioresource Technology*, vol. 87, pp. 41–44., [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00202-X](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00202-X).
- Neves, P. D. O. (2015). Importância dos compostos fenólicos dos frutos na promoção da saúde. s [Master's thesis, Universidade Fernando Pessoa]. Disponível em: <https://bdigital.ufp.pt/handle/10284/5241>. Acesso em: 15 de maio de 2022.
- Notarnicola, B., Hayashi, K., Curran, M. A., & Huisingh, D. (2012). Progress in working towards a more sustainable agri-food industry. *Journal of Cleaner Production*, 28, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2012.02.007>.
- Oliveira, R. M., Oliveira, M. O., Hernandez, J., & Jacques, A. Composição centesimal de farinha de uva elaborada com bagaço da indústria vitivinícola. (2016). *Revista CSBEA*. Disponível em: <https://www.revistas.udesc.br/index.php/revistacsbea/article/view/7331>. Acesso: 09 de junho de 2022.
- Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV). (2021). The OIV Statistical Report on World Vitiviniculture 2021. Disponível em: <https://www.oiv.int/what-we-do/country-report?oiv=>.
- Özkan, G., Sagdiç, O., Baydar, N. G., & Kurumahmutoglu, Z. (2004). Antibacterial Activities and Total Phenolic Contents of Grape Pomace Extracts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 84, no. 14, pp. 1807–1811., <https://doi.org/10.1002/jsfa.1901>.
- Pan, Z., Qu, W., Ma, H., Atungulu, G. G., & McHugh, T. H. (2012). Continuous and pulsed ultrasound-assisted extractions of antioxidants from Pomegranate Peel. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19(2), 365–372. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2011.05.015>.
- Peixoto, C. M., Dias, M. I., Alves, M. J., Calhella, R. C., Barros, L., Pinho, S. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2018). Grape Pomace as a Source of Phenolic Compounds and Diverse Bioactive Properties. *Food Chemistry*, vol. 253, pp. 132–138., <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.163>.
- Pezzini, V., Agostini, F., Smiderle, F., Touguinha, L., Salvador, M., & Moura, S. (2018). Grape juice by-products extracted by ultrasound and microwave-assisted with

- different solvents: A rich chemical composition. *Food Science and Biotechnology*, 28(3), 691–699. <https://doi.org/10.1007/s10068-018-0531-x>
- Pintado, M. E. & Teixeira, J. A. (2015). Valorização de subprodutos da indústria alimentar: obtenção de ingredientes de valor acrescentado. *Boletim de Biotecnologia*. Retrieved from: <http://repositorium.sdum.uminho.pt/handle/1822/35328>.
- Ponta, L., Puliga, G., Manzini, R., & Cincotti, S. (2022). Sustainability-oriented innovation and co-patenting role in Agri-Food Sector: Empirical analysis with patents. *Technological Forecasting and Social Change*, 178, 121595. <https://doi.org/10.1016/j.techfore.2022.121595>.
- Prozil, S. O., Evtuguin, D. V., & Lopes, L. P. (2012). Chemical composition of grape stalks of *Vitis vinifera* L. from red grape pomaces. *Industrial Crops and Products*, 35(1), 178–184. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.06.035>.
- Puangpraphant, S., Cuevas-Rodríguez, E.-O., & Oseguera-Toledo, M. (2022). Anti-inflammatory and antioxidant phenolic compounds. *Current Advances for Development of Functional Foods Modulating Inflammation and Oxidative Stress*, 165–180. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-823482-2.00018-2>.
- Rasines-Perea, Z., Ky, I., Cros, G., Crozier, A., & Teissedre, P.-L. (2018). Grape Pomace: Antioxidant Activity, Potential Effect against Hypertension and Metabolites Characterization after Intake. *Diseases*, vol. 6, no. 3, p. 60., <https://doi.org/10.3390/diseases6030060>.
- Ravindran, R., & Jaiswal, A. K. (2016). Exploitation of food industry waste for high-value products. *Trends in Biotechnology*, 34(1), 58–69. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.10.008>.
- Romanini, E. B., Rodrigues, L. M., Finger, A., Chierrito, T. P. C., Scapim, M. R. D. S., & Madrona, G. S. (2021). Ultrasound Assisted Extraction of Bioactive Compounds from BRS Violet Grape Pomace Followed by Alginate-ca²⁺ Encapsulation. *Food Chemistry*, vol. 338, p. 128101., <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128101>.
- Routray, W., Jena, B. S., & Orsat, V. (2022). Recent advances in extraction, isolation, characterization, and applications of phenolic compounds. *Studies in Natural Products Chemistry*, 29–55. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-823944-5.00006-5>

- Sabra, A., Netticadan, T., & Wijekoon, C. (2021). Grape bioactive molecules, and the potential health benefits in reducing the risk of heart diseases. *Food Chemistry: X*, 12, 100149. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2021.100149>.
- Shirahigue, L. D., & Ceccato-Antonini, S. R. (2020). Agro-Industrial Wastes as Sources of Bioactive Compounds for Food and Fermentation Industries. *Ciência Rural*, vol. 50, no. 4, 2020, <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20190857>.
- Sicari, V., Pellicanò, T. M., Laganà, V., & Poiana, M. (2017). Use of orange by-products (dry peel) as an alternative gelling agent for Marmalade Production: Evaluation of Antioxidant Activity and inhibition of HMF formation during different storage temperature. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(2). <https://doi.org/10.1111/jfpp.13429>.
- Silva, V., Igrejas, G., Falco, V., Sntos, T. P., Torres, C., Oliveira, A. M. P., Pereira, J. E., Amaral, J. S., & Poeta, P. (2018). Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Phenolic Compounds Extracted from Wine Industry by-Products. *Food Control*, vol. 92, pp. 516–522., <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.05.031>.
- Simões, S., Costa, A., Faria-Silva, A. C., Ascenso, A., Marto, J., Carvalheiro, M., Gonçalves, L. M., Marques, M., Paiva, A., Bento, M., Simões, P., & Ribeiro, H. M. (2021). Sustainable valorization of food-processing industry by-products: Challenges and opportunities to obtain bioactive compounds. *Valorization of Agri-Food Wastes and By-Products*, 619–644. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-824044-1.00023-4>.
- Soković, M., & Van Griensven, L. J. L. D. (2006). Antimicrobial activity of essential oils and their components against the three major pathogens of the cultivated button mushroom, *Agaricus bisporus*. *European Journal of Plant Pathology*, 116, 211–224. doi: 10.1007/s10658-006-9053-0.
- Sousa, E. C., Uchôa-Thomaz, A. M. A., Carioca, J. O. B., Morais, S. M. De, De Lima, A., Martins, C. G., Alexandrino, C. D., Ferreira, P. A. T., Rodrigues, A. L. M., Rodrigues, S. P., Silva, J. Do N., & Rodrigues, L. L. (2014). Chemical composition and bioactive compounds of grape pomace (*Vitis vinifera* L.), Benitaka variety, grown in the semiarid region of Northeast Brazil. *Food Science and Technology*.

- Spigno, G., Marinoni, L., & Garrido, G. D. (2017). State of the art in grape processing by-products. *Handbook of Grape Processing By-Products*, 1–27. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809870-7.00001-6>.
- Theagarajan, R., Malur Narayanaswamy, L., Dutta, S., Moses, J. A., & Chinnaswamy, A. (2019). Valorisation of grape pomace (cv. *muscat*) for development of functional cookies. *International Journal of Food Science & Technology*, 54(4), 1299–1305. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14119>.
- Tiwari, S., Upadhyay, N., Singh, A. K., Meena, G. S., & Arora, S. (2019). Organic solvent-free extraction of carotenoids from carrot bio-waste and its physico-chemical properties. *Journal of Food Science and Technology*, 56(10), 4678–4687. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03920-5>.
- Topalović, A., Knežević, M., Bajagić, B., Ivanović, L., Milašević, I., Đurović, D., Mugoša, B., Podolski-Renić, A., & Pešić, M. (2020). Grape (*vitis vinifera* L.): Health benefits and effects of growing conditions on quality parameters. *Biodiversity and Biomedicine*, 385–401. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819541-3.00020-7>.
- Trikas, E. D., Melidou, M., Papi, R. M., Zachariadis, G. A., & Kyriakidis, D. A. (2016). “Extraction, Separation and Identification of Anthocyanins from Red Wine by-Product and Their Biological Activities.” *Journal of Functional Foods*, vol. 25, pp. 548–558., <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.06.033>.
- Venkatasamy, C., Zhao, L., Zhang, R., & Pan, Z. (2019). Grapes. *Integrated Processing Technologies for Food and Agricultural By-Products*, 133–163. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814138-0.00006-x>.
- Vieira, G.S. (2015). Estudo dos processos de extração de Antocianinas da polpa de juçara (*Euterpe edulis Mart.*) e da concentração do extrato por nanofiltração. Tese (Doutoramento em Engenharia de Alimentos), UNICAMP, Campinas.
- Xu, Y., Burton, S., Kim, C., & Sismour, E. (2015). Phenolic Compounds, Antioxidant, and Antibacterial Properties of Pomace Extracts from Four Virginia-Grown Grape Varieties. *Food Science & Nutrition*, vol. 4, no. 1, pp. 125–133., <https://doi.org/10.1002/fsn3.264>.
- Yadav, D., Kumar, A., Kumar, P., & Mishra, D. (2015). Antimicrobial Properties of Black Grape (*Vitis Vinifera* L.) Peel Extracts against Antibiotic-Resistant Pathogenic

- Bacteria and Toxin Producing Molds. *Indian Journal of Pharmacology*, vol. 47, no. 6, p. 663. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.169591>.
- Yu, J., & Ahmedna, M. (2012). Functional components of grape pomace: Their composition, biological properties and potential applications. *International Journal of Food Science & Technology*, 48(2), 221–237. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03197.x>.
- Zayed, A., Badawy, M. T., & Farag, M. A. (2021). Valorization and extraction optimization of citrus seeds for food and functional food applications. *Food Chemistry*, 355, 129609. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129609>.
- Zhang, H., & Tsao, R. (2016). Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Current Opinion in Food Science*, 8, 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.02.002>.
- Zhu, M., Huang, Y., Wang, Y., Shi, T., Zhang, L., Chen, Y., & Xie, M. (2019). Comparison of (Poly)Phenolic Compounds and Antioxidant Properties of Pomace Extracts from Kiwi and Grape Juice. *Food Chemistry*, vol. 271, pp. 425–432. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.151>.