

# Valorização do bagaço de uva: microencapsulação de extratos ricos em compostos fenólicos para aplicação na indústria de queijos

---

**Dissertação de Mestrado em Bioengenharia**  
Especialização em Engenharia Biológica

**Raquel Correia Gonçalves**

realizada em:

**Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente, Biotecnologia e Energia**



**Orientador: Professora Doutora Lúcia Santos**

**Departamento de Engenharia Química**

**Porto, junho de 2020**



*“Courage doesn't always roar. Sometimes courage is the quiet voice at the end of the day saying 'I will try again tomorrow'.”*

**Mary Anne Radmacher**



# Agradecimentos

A dissertação representa o fim de um capítulo. Um capítulo marcado por inúmeros desafios, incertezas e muito esforço, mas também por alegrias, superação e amizade. E como a vida é feita de momentos e de pessoas que os tornam especiais, quero agradecer profundamente a todas as pessoas que, de alguma forma, estiveram ao meu lado, durante os últimos e mais desafiantes 5 anos da minha vida.

À minha orientadora, Professora Lúcia Santos, pela oportunidade que me deu em fazer parte do projeto. Agradeço toda a sua disponibilidade, atenção, dedicação e compreensão.

Ao Sérgio, por tudo o que me ensinou desde o primeiro dia em que entrei no E201. Obrigada pela orientação, por todo o apoio e companheirismo.

À Engenheira Berta Castilho, por todo o interesse demonstrado em colaborar na realização do projeto e por me receber, de forma tão prestável, na empresa.

Aos meus colegas e amigos do ramo de Engenharia Biológica, por tornarem tudo mais fácil e por me terem proporcionado alguns dos melhores momentos que vivi no curso. Agradeço em especial ao Bernardo, à Ana, ao Fábio, ao Tomás, ao Olaf e ao Bogas. Sem a vossa amizade e sem as nossas brincadeiras, estes anos teriam sido muito mais difíceis (e menos felizes).

A todos os meus amigos, mas em especial à Melissa, Kika e Mélanie, por serem as melhores amigas que podia pedir. Sempre juntas.

Aos meus pais, agradeço por tudo o que sou e pelo apoio incondicional. Tenho uma sorte enorme por vos ter e sou grata por todos os esforços que fizeram por mim. Obrigada por tudo.

À minha avó, por ser a minha força.

À minha madrinha e aos primos Bruno e Bea, pelo amor.

Ao D., por ter sido o meu porto seguro nestes meses mais difíceis.

Este trabalho foi financiado por: Unidade de Investigação UID/EQU/00511/2019 - Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente, Biotecnologia e Energia - LEPABE - financiado por fundos nacionais através da FCT/MCTES (PIDDAC).



# Resumo

A indústria do vinho gera quantidades significativas de bagaço de uva, cujo tratamento inadequado, descarte e acumulação gera problemas ambientais, com impacto social e económico. Como consequência, a recuperação e valorização deste subproduto tornou-se cada vez mais importante para melhorar a sustentabilidade da atividade vitivinícola.

A valorização do bagaço de uva é focada na extração de compostos de interesse, nomeadamente dos compostos fenólicos que ficam retidos neste resíduo após o processamento do vinho. Os compostos fenólicos apresentam propriedades antioxidantes e antimicrobianas, contribuindo positivamente para a saúde humana, especialmente na prevenção de doenças cardiovasculares e degenerativas. Contudo, possuem aplicação limitada na indústria, uma vez que são facilmente degradados por possuírem baixa estabilidade a fatores ambientais, como temperatura, luz e pH. Face a esta limitação, a abordagem da microencapsulação permite melhorar a estabilidade e a biodisponibilidade dos compostos fenólicos, além de permitir controlar a sua taxa de libertação. As características finais das micropartículas podem ser avaliadas pela determinação da eficiência de encapsulação e do rendimento de produção, e pela análise do tamanho médio das partículas, da distribuição do tamanho, da morfologia da superfície das partículas e ainda do perfil de libertação dos compostos bioativos.

As estratégias combinadas de extração dos compostos fenólicos do bagaço de uva e de microencapsulação contribuem para promover a sustentabilidade do setor do vinho e para permitir a obtenção de produtos de elevado valor acrescentado. Neste contexto, a presente dissertação fornece uma visão geral sobre os métodos de extração e microencapsulação, discutindo a aplicação de micropartículas carregadas com extratos ricos em compostos fenólicos no setor alimentar e em particular no queijo Marinhas.

O queijo Marinhas, produzido pela empresa Lacticínios das Marinhas, é um produto autêntico e natural, isento de corantes, conservantes ou outros aditivos. A incorporação de micropartículas carregadas com extratos ricos em compostos fenólicos de bagaço de uva surge como uma solução promissora para a preservação do queijo, assim como para a melhoria das propriedades nutricionais e com potenciais efeitos positivos na saúde humana. No sentido de avaliar o cumprimento dos objetivos da fortificação, das características dos queijos produzidos e da aceitação do consumidor, é importante a realização de análises físico-químicas, microbiológicas e sensoriais.

**Palavras-chave:** bagaço de uva; compostos fenólicos; antioxidantes; microencapsulação; queijo





# Abstract

The wine industry generates significant quantities of grape pomace, whose inadequate treatment, disposal and accumulation creates environmental problems, with both social and economic impacts. Thus, the recovery and appreciation of this by-product has become increasingly important to improve the sustainability of the wine industry.

The valorisation of grape pomace is focused on the extraction of compounds of interest, namely the phenolic compounds that are retained in this residue once the wine has been processed. Phenolic compounds present antioxidant and antimicrobial properties, contributing positively to human health, especially in the prevention of cardiovascular and degenerative diseases. Nonetheless, they have a limited application in the industry since they are easily degraded due to low stability to environmental factors such as temperature, light and pH. Considering this limitation, the microencapsulation approach makes it possible to improve the stability and bioavailability of phenolic compounds, in addition to allowing a control of their release rate. The final characteristics of the microparticles can be evaluated by determining the encapsulation efficiency as well as the production yield, and by analysing the average particle size, the size distribution, the surface morphology of the particles and the release profile of the bioactive compounds.

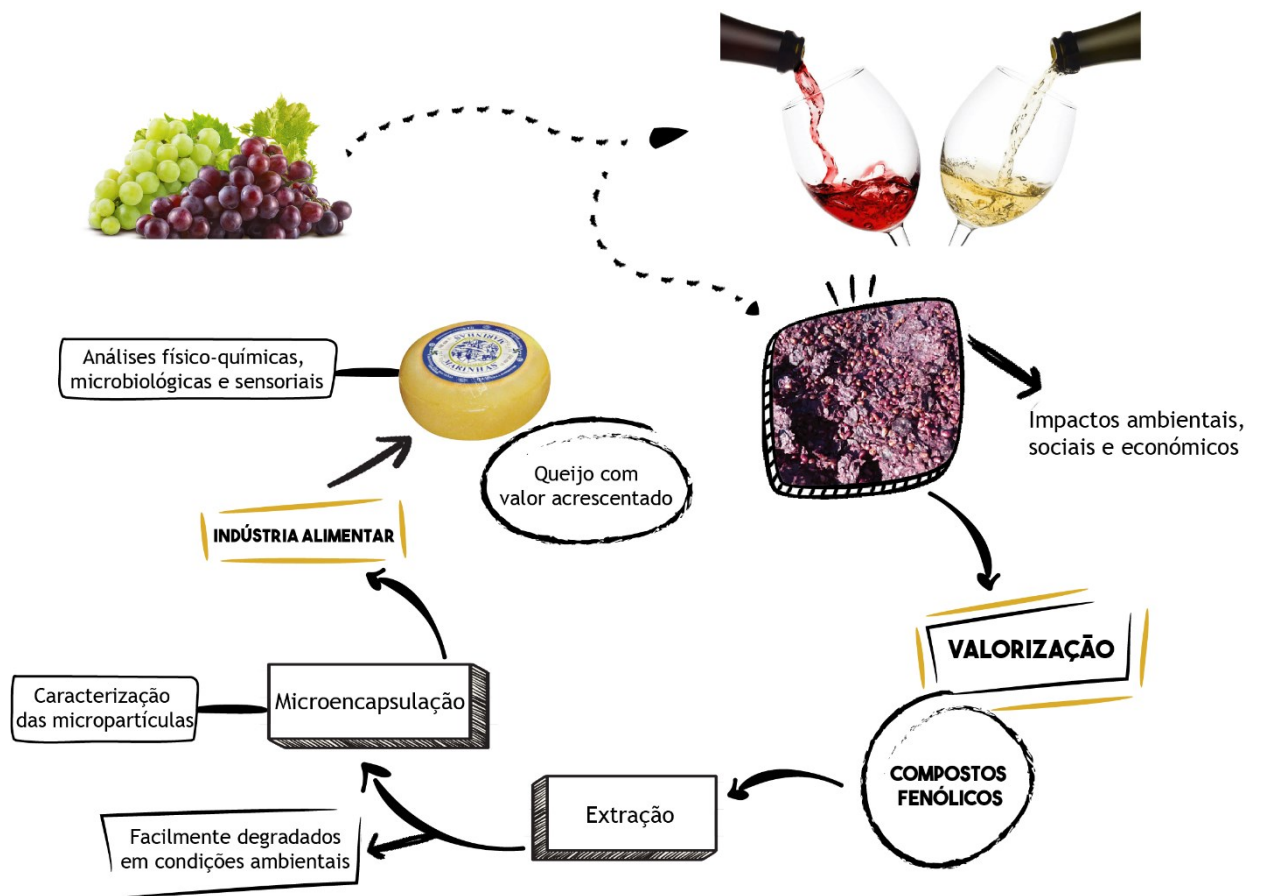
The combined strategies for the extraction of phenolic compounds from grape pomace and microencapsulation are a contribution to promote the sustainability of the wine sector while obtaining products with high added value. In this respect, this dissertation provides an overview of the methods of extraction and microencapsulation, discussing the application of microparticles loaded with extracts rich in phenolic compounds in the food sector, mainly in the "Marinhas" cheese.

The "Marinhas" cheese, produced by the company Lactínios das Marinhas, is an authentic and natural product, free from colourings, preservatives or other additives. The incorporation of microparticles loaded with extracts rich in phenolic compounds of grape pomace emerges as a promising solution for the preservation of cheese, as well as for the improvement of its nutritional properties, and with potential positive effects on human health. In order to assess whether the aims of fortification were achieved, as well as the characteristics of the cheeses produced and consumer acceptance, it is important to carry out physicochemical, microbiological and sensory tests.

**Key words:** grape pomace; phenolic compounds; antioxidants; microencapsulation; cheese



# Resumo Gráfico





## Declaração

Eu, Raquel Correia Gonçalves, declaro, sob compromisso de honra, que este trabalho é original e que todas as contribuições não originais foram devidamente referenciadas com identificação da fonte.

*Raquel Correia Gonçalves*

---

*(Raquel Correia Gonçalves)*

Porto, 29 de junho de 2020



# Índice

Agradecimentos .....	i
Resumo.....	iii
Abstract.....	v
Resumo Gráfico.....	vii
Declaração .....	ix
Notação e Glossário.....	xvii
<b>1 Introdução .....</b>	<b>1</b>
1.1 Enquadramento e Apresentação do Projeto.....	1
1.2 Apresentação da empresa Lacticínios das Marinhas .....	2
1.3 Organização da dissertação.....	2
<b>2 Contexto e Estado da Arte .....</b>	<b>3</b>
2.1 Bagaço de uva .....	3
2.2 Composição do bagaço de uva .....	5
2.2.1 Constituintes fenólicos .....	6
2.3 Extração dos compostos fenólicos do bagaço de uva .....	9
2.3.1 Técnicas de extração de compostos fenólicos do bagaço de uva .....	9
2.4 Microencapsulação de extratos ricos em compostos fenólicos obtidos a partir de bagaço de uva .....	16
2.4.1 Agentes encapsulantes .....	18
2.4.2 Técnicas de microencapsulação de extratos ricos em compostos fenólicos obtidos a partir de bagaço de uva.....	19
2.4.3 Caracterização das micropartículas .....	24
2.5 Determinação do teor fenólico total e da atividade antioxidante .....	28
2.6 Aplicação na indústria alimentar .....	29
2.7 Caso de estudo: fortificação de queijo.....	38
2.7.1 Fabrico do queijo Marinhas .....	39
2.7.2 Avaliação do queijo fortificado .....	40
<b>3 Conclusões .....</b>	<b>45</b>
<b>4 Limitações e trabalho futuro .....</b>	<b>47</b>
Referências .....	49
Anexos .....	59
Anexo A - Método para a extração dos compostos fenólicos do bagaço de uva.....	61
Anexo B - Método para a microencapsulação do extrato rico em compostos fenólicos .....	63
Anexo C - Morfologia das micropartículas.....	65
Anexo D - Estudos de libertação <i>in vitro</i> em fluidos gastrointestinais simulados ..	67

Anexo E - Método <i>Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses</i> (PRISMA) .....	69
Anexo F - Carta de Conforto/Apoio .....	71
Anexo G - Fluxograma da produção do queijo Marinhos .....	73



# Lista de Figuras

<b>Figura 1</b> - Países com maior produção de vinho em 2018, segundo o Relatório Estatístico sobre Vitivinicultura Mundial da OIV (OIV, 2019). .....	3
<b>Figura 2</b> - Componentes do bagaço de uva e principais compostos obtidos a partir destes (adaptado de (Beres <i>et al.</i> , 2017)). .....	6
<b>Figura 3</b> - Classificação dos compostos fenólicos e principais compostos encontrados no bagaço de uva (adaptado de (Beres <i>et al.</i> , 2017)). .....	7
<b>Figura 4</b> - Principais propriedades apresentadas pelos compostos fenólicos encontrados no bagaço de uva. ....	9
<b>Figura 5</b> - Representação esquemática dos principais passos para a extração dos compostos fenólicos do bagaço de uva pela técnica de extração sólido-líquido. ....	16
<b>Figura 6</b> - Principais morfologias encontradas em partículas obtidas por microencapsulação: (A) microcápsulas e (B) microesferas (adaptado de (Fang e Bhandari, 2010)). ....	17
<b>Figura 7</b> - Estrutura química da etilcelulose. ....	19
<b>Figura 8</b> - Esquema representativo da técnica de spray drying (adaptado de (Rigobelo, 2012)), com as etapas principais: homogeneização do material do núcleo com o material encapsulante; atomização da mistura no <i>spray dryer</i> e recuperação das micropartículas através do ciclone. ....	22
<b>Figura 9</b> - Representação esquemática dos principais passos para a obtenção de micropartículas pela técnica de dupla emulsão água em óleo em água por evaporação de solvente. ....	24
<b>Figura 10</b> - Mecanismos de libertação: (A) difusão através de poros preenchidos com água, (B) difusão através do polímero, (C) osmose e (D) erosão (retirada de (Fredenberg <i>et al.</i> , 2011)). ....	27
<b>Figura 11</b> - Exemplos de perfis de libertação (adaptado de (Fredenberg <i>et al.</i> , 2011)). .....	27
<b>Figura 12</b> - Número de publicações incluídas na revisão sistemática de incorporação de extratos ricos em compostos fenólicos de bagaço de uva para cada categoria de alimentos, durante o período de 2000-2020. ....	31
<b>Figura A 1</b> - Montagem da extração sólido-líquido. ....	61
<b>Figura B 1</b> - Etapa de evaporação do solvente. ....	63
<b>Figura B 2</b> - Etapa de filtração, para recuperação das micropartículas. ....	64
<b>Figura B 3</b> - Micropartículas recuperadas no filtro. ....	64
<b>Figura C 1</b> - Imagens obtidas no microscópio eletrônico de varrimento, de micropartículas de etilcelulose carregadas com extrato rico em compostos fenólicos de bagaço de uva (ampliação 10000x apresentada em (A) e 4900x apresentada em (B)). As imagens foram cedidas pelo mestre Sérgio Moreira. ....	65
<b>Figura E 1</b> - Diagrama de fluxo PRISMA da pesquisa sobre a incorporação de extratos ricos em compostos fenólicos de bagaço de uva em alimentos. ....	70

**Figura E 2** - Diagrama de fluxo PRISMA da pesquisa sobre a incorporação de micropartículas carregadas com extratos ricos em compostos fenólicos de bagaço de uva em alimentos. ....70

**Figura F 1** - Fluxograma de produção do queijo Marinhas produzido na Lacticínios das Marinhas. A pasteurização indicada a vermelho representa o ponto crítico de controlo do processo.....73

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1</b> - Exemplos de estudos da literatura sobre a extração de compostos fenólicos do bagaço de uva.....	10
<b>Tabela 2</b> - Exemplos de estudos da literatura sobre a microencapsulação de extratos ricos em compostos fenólicos do bagaço de uva.....	20
<b>Tabela 3</b> - Estudos da literatura relativos à incorporação de extratos ricos em compostos fenólicos de bagaço de uva em produtos alimentares (entre 2000 e 2020). ....	32
<b>Tabela 4</b> - Estudos da literatura relativos à incorporação de micropartículas carregadas com extratos ricos em compostos fenólicos de bagaço de uva em produtos alimentares (entre 2000 e 2020).....	36
<b>Tabela 5</b> - Análises físico-químicas, microbiológicas e sensoriais a considerar na avaliação dos queijos fortificados. ....	40
<b>Tabela D 1</b> - Concentração dos eletrólitos para cada fluido gastrointestinal simulado (retirado de: (Minekus <i>et al.</i> , 2014). ....	67
<b>Tabela D 2</b> - Procedimento experimental para os estudos de liberação <i>in vitro</i> (retirado de: (Minekus <i>et al.</i> , 2014). ....	67



## Notação e Glossário

$f$	Frequência	kHz
$m_{CB}$	Massa de compostos bioativos microencapsulados	mg
$m_I$	Massa de compostos bioativos inicialmente adicionada na microencapsulação	mg
$m_M$	Massa de micropartículas secas	mg
$m_O$	Massa de compostos bioativos que não foram microencapsulados	mg
$m_P$	Massa de polímero usada na microencapsulação	mg
$P$	Pressão	MPa
$t$	Tempo	min h
$T$	Temperatura	°C

### **Lista de Siglas**

A/O	Água em óleo
A/O/A	Água em óleo em água
A1	Fase aquosa interna
A2	Fase aquosa externa
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
BAUV	Bagaço de uva
DCC	Doenças cardíacas coronárias
EAM	Extração assistida por micro-ondas
EAU	Extração assistida por ultrassons
EC	Etilcelulose
EE	Eficiência de encapsulação
ELP	Extração por líquido pressurizado
ESC	Extração supercrítica
ESL	Extração sólido-líquido
FC	Folin-Ciocalteu
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GAE	Equivalentes de ácido gálico
GRAS	Geralmente reconhecido como seguro
MD	Maltodextrina
MDA	Malondialdeído
MEV	Microscópio eletrônico de varrimento
O	Fase orgânica

O/A	Óleo em água
O/A/O	Óleo em água em óleo
OIV	Organização Internacional da vinha e do vinho
PIE	Proteína isolada de ervilha
PISL	Proteína isolada de soro de leite
PRISMA	<i>Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses</i>
RE	Rendimento de extração
RP	Rendimento de produção
S-CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono supercrítico
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TEAC	Atividade antioxidante equivalente ao Trolox
VP	Valor de peróxido

# 1 Introdução

## 1.1 Enquadramento e Apresentação do Projeto

Estimativas sugerem que na União Europeia (UE) e no Reino Unido são geradas anualmente cerca de 88 milhões de toneladas de resíduos alimentares, o correspondente a 173 kg por pessoa (FUSIONS, 2016). Dados apontam que aproximadamente 70% do desperdício alimentar ocorre nas habitações e no processamento dos alimentos (FUSIONS, 2016), destacando-se, para este caso, a indústria agroalimentar como um dos setores que mais contribui para a produção de resíduos alimentares (FAO, 2011). Com a produção de resíduos de culturas na colheita da matéria-prima (como folhas, ramos e raízes) e de resíduos gerados durante o processo pós-colheita (como cascas, palha e bagaço) (Santana-Méridas, González-Coloma e Sánchez-Vioque, 2012), as atividades agroalimentares têm um impacto significativo no ambiente, bem como na economia e na sociedade (FUSIONS, 2016).

Com a globalização do mercado e as atuais tendências de aumento populacional e escassez de recursos, há a necessidade de transitar para um paradigma mais sustentável, que assegure o desenvolvimento económico e a qualidade ambiental (Caldeira *et al.*, 2019; Treichel *et al.*, 2020). Neste sentido, a UE tem promovido o conceito de ecologia industrial, numa abordagem de economia circular e de “zero desperdício” (Mirabella, Castellani e Sala, 2014; Korhonen, Honkasalo e Seppälä, 2018). Com isto, o objetivo é minimizar a utilização de recursos e a produção de resíduos, reforçando o uso de fluxos circulares de reutilização, reciclagem e recuperação, para que os resíduos se tornem num recurso para novos produtos e aplicações (Comissão Europeia, 2015; Jurgilevich *et al.*, 2016).

A investigação científica tem apostado cada vez mais na valorização de subprodutos agrícolas, realçando-se o caso do bagaço de uva (BAUV), obtido no processo de vinificação. O BAUV é, de facto, o principal resíduo orgânico sólido das indústrias vitivinícolas, estimando-se que se gera 1 kg deste resíduo por cada 6 L de vinho produzido (Tsali e Goula, 2018). A sua valorização passa pela recuperação de inúmeros compostos de elevado valor, como é o caso dos compostos fenólicos, que têm atraído muita atenção devido às propriedades antioxidantes e efeitos benéficos e promotores de saúde humana que apresentam (Fontana, Antonioli e Bottini, 2013; Tsali e Goula, 2018).

A presente dissertação tem como objetivo apresentar uma estratégia de valorização do BAUV, através da extração de compostos fenólicos, com posterior microencapsulação do extrato e aplicação no setor alimentar. Neste sentido, pretende-se definir uma proposta de metodologias de extração e de microencapsulação, através de um levantamento bibliográfico relativo às metodologias mais recentes e mais utilizadas na temática. Além disso, a dissertação tem como objetivo fazer uma revisão sistemática referente à incorporação de extratos ricos em compostos fenólicos de BAUV e de micropartículas carregadas com os extratos referidos em

produtos alimentares. Pretende, ainda, destacar o caso de estudo da fortificação do queijo Marinhas produzido pela Lacticínios das Marinhas e propor análises físico-químicas, microbiológicas e sensoriais para a avaliação dos queijos fortificados. No resumo gráfico estão esquematizados os principais objetivos a abordar nesta dissertação.

## **1.2 Apresentação da empresa Lacticínios das Marinhas**

A Lacticínios das Marinhas situa-se na freguesia das Marinhas, concelho de Esposende. Fundada em 1954, foi a primeira empresa de lacticínios em Portugal a obter certificação em segurança alimentar através do *Hazard Analysis and Critical Control Points* (HACCP), em 2002. Através da autenticidade dos processos tradicionais e artesanais, usam receitas originais, sem adição de corantes ou conservantes. Diferenciando-se pela tradição e qualidade, a empresa de lacticínios produz uma das melhores manteigas do mundo, segundo a revista inglesa *Wallpaper*, e um queijo magro único, recomendado pelos médicos. Atendendo ao facto de não utilizar conservantes, a empresa apoiou desde logo o presente projeto por considerar inovador para o setor, nomeadamente para os queijos que produz.

## **1.3 Organização da dissertação**

A presente dissertação está dividida em 4 capítulos. O primeiro capítulo, designado de “Introdução”, engloba o enquadramento geral e a apresentação do projeto, a apresentação da empresa que apoiou o projeto e a descrição da organização da dissertação. O segundo capítulo, intitulado “Contexto e Estado da Arte”, apresenta todo o desenvolvimento da temática, fazendo referência à obtenção do bagaço de uva e à sua composição, aos métodos de extração e de microencapsulação e à caracterização das micropartículas obtidas. Inclui ainda uma descrição sucinta da metodologia para a determinação do teor em compostos fenólicos bem como da atividade antioxidante, e uma revisão da incorporação de extratos ricos em compostos fenólicos de bagaço de uva e de micropartículas carregadas com os extratos referidos em produtos alimentares. Neste capítulo, destaca-se ainda o caso de estudo da fortificação do queijo Marinhas. O terceiro capítulo diz respeito às conclusões da dissertação e o quarto refere-se às limitações e sugestões de trabalho futuro. Por último, pode ser consultada a secção de “Referências” e encontradas informações adicionais ao esclarecimento de determinados assuntos na secção “Anexos”.



## 2 Contexto e Estado da Arte

### 2.1 Bagaço de uva

As uvas são uma das frutas convencionais mais cultivadas e valorizadas no mundo (Zhu *et al.*, 2015), com uma produção anual de quase 78 milhões de toneladas (OIV, 2019). Estas podem ser consumidas de uma forma direta, ou então utilizadas na formulação de outros produtos, de entre os quais se podem destacar o vinho, o vinagre, a geleia e ainda o óleo de sementes (Beres *et al.*, 2017). Conforme consta no Relatório Estatístico sobre Vitivinicultura Mundial da Organização Internacional da vinha e do vinho (OIV), cerca de 57% da produção mundial de uva em 2018 destinou-se à produção de vinho (OIV, 2019), sendo este um setor importante na economia de alguns países (Ruggieri *et al.*, 2009). Da lista de países com maior produção de vinho, Portugal ocupa o 11º lugar, com uma produção de 6,1 milhões de hectolitros (hL) (Figura 1).

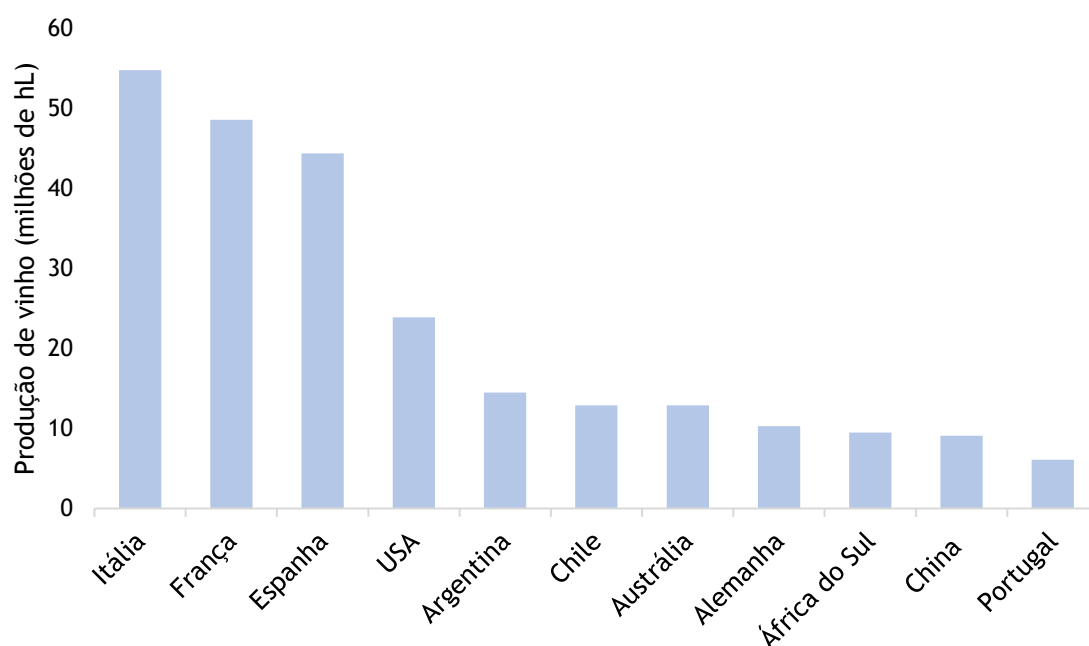


Figura 1 - Países com maior produção de vinho em 2018, segundo o Relatório Estatístico sobre Vitivinicultura Mundial da OIV (OIV, 2019).

No processo de vinificação, dependendo da composição desejada para o vinho, as hastes das uvas podem ser removidas ou não, já que possuem elevada concentração em taninos (Beres *et al.*, 2017). As uvas, por sua vez, são esmagadas de modo a permitir a expulsão do sumo da uva, que contém os açúcares necessários à fermentação (Dwyer, Hosseinian e Rod, 2014). Consoante o tipo de vinho que se pretende produzir (tinto ou branco), surgem certas diferenças no processo. No processamento do vinho tinto, a fermentação do sumo extraído da uva ocorre em conjunto com as sementes e a casca, o que permite fornecer os pigmentos necessários à

cor vermelha do vinho. Por sua vez, no processamento do vinho branco, as uvas são prensadas antes da fermentação, contrariamente ao que acontece no processamento no vinho tinto, não sendo incluídas as sementes e a casca no passo da fermentação, uma vez que a presença de cor é indesejável no vinho branco (Dwyer, Hosseinian e Rod, 2014). O processo de vinificação, em geral, não induz grandes alterações químicas no conteúdo das uvas. À exceção do passo de fermentação, que promove alterações na composição de carboidratos, os restantes processos, como o esmagamento e a prensagem das uvas, são processos físicos que não causam alterações na composição química das uvas (Beres *et al.*, 2017).

A indústria do vinho gera quantidades significativas de resíduos, entre os quais o bagaço de uva (BAUV), borras de levedura e efluentes líquidos (Tsali e Goula, 2018). O BAUV é o principal resíduo orgânico sólido produzido, compreendendo essencialmente as cascas de uvas, sementes e hastes (Zhu *et al.*, 2015; Beres *et al.*, 2017). A quantidade deste resíduo produzida na vinificação depende da espécie de uva usada e das etapas de fermentação, assim como do processo/equipamento utilizado na prensagem (Beres *et al.*, 2017). Contudo, estudos referem que o bagaço corresponde, geralmente, a aproximadamente 20 a 25% do peso inicial da uva (Yu e Ahmedna, 2013).

O reaproveitamento do BAUV passa, tradicionalmente, pela destilação para a produção de diferentes bebidas alcoólicas valorizadas, nomeadamente bebidas destiladas, como por exemplo a aguardante bagaceira (Cortés e Fernández, 2011) e licores (García-Lomillo e González-SanJosé, 2017). Para além disso, tem sido usado para alimentação animal (Kalli *et al.*, 2018) e como aditivo na produção de tijolos com o objetivo de melhorar o isolamento térmico (Muñoz *et al.*, 2014). Contudo, apesar dos usos alternativos, grandes quantidades de BAUV são descartadas em aterros, o que constitui um problema de gestão de resíduos. Esta situação sofre um agravamento durante o período de colheita, o qual se estende desde o mês de agosto, até ao mês de outubro. Durante este intervalo, é produzida uma grande quantidade de bagaço, que irá, por conseguinte, aumentar a sua concentração por área de aterro. Isto acarreta várias consequências ambientais devido ao facto dos compostos fenólicos, presentes no BAUV, diminuírem o pH deste resíduo, aumentando assim a resistência à degradação biológica do mesmo. A poluição das águas superficiais e subterrâneas, a atração de moscas e pragas passíveis de transmissão de variadas doenças, os odores desagradáveis e os lixiviados de taninos e outros compostos que possibilitam a depleção de oxigénio no solo e nas águas subterrâneas (afetando assim a flora e a fauna circundantes), são também outras questões que têm que ser tidas em conta devido ao seu impacto nefasto a nível ambiental (Dwyer, Hosseinian e Rod, 2014). Para além disto, surge também o facto de o BAUV inibir a germinação de sementes (Fontana, Antonioli e Bottini, 2013), já que os compostos fenólicos apresentam efeitos fitotóxicos, que dependem sobretudo da natureza e da posição dos substituintes nos anéis aromáticos (Bouknana *et al.*, 2019).

Neste contexto, há um crescente interesse na prática de uma atividade vitivinícola sustentável, que possibilite a redução de riscos ambientais e humanos, assim como de custos associados. Uma abordagem alternativa e promissora para a valorização do BAUV prende-se com a recuperação de compostos bioativos. Sobressaem assim os compostos fenólicos, tanto pela sua atividade antioxidante e antimicrobiana como pelos inúmeros benefícios para a saúde humana. Com destaque no setor alimentar, o uso potencial destes compostos permite melhorar a qualidade dos produtos alimentares, bem como desenvolver ingredientes e produtos com elevado valor acrescentado (Beres *et al.*, 2017).

## 2.2 Composição do bagaço de uva

A composição química do BAUV pode variar consideravelmente, dependendo de fatores intrínsecos, como a variedade e maturidade das uvas (González-SanJosé, Barron e Díez, 1990; González-SanJosé, Santa-Maria e Díez, 1990; Kennedy, Matthews e Waterhouse, 2000), e de fatores extrínsecos, tais como as condições edafoclimáticas (Kliewe, 1997) e as práticas vitícolas (Freeman, 1979). Para além disso, também o tipo de processo e as condições com que a vinificação ocorre contribuem para influenciar a composição do BAUV (González-SanJosé, Santa-Maria e Díez, 1990).

Considerando os principais componentes do BAUV, as sementes constituem aproximadamente 38% a 52% do resíduo sólido (Brenes *et al.*, 2016), com a restante percentagem a incluir as cascas e as hastes das uvas, tal como indicado na Figura 2. Os principais compostos constituintes do bagaço seco são as fibras dietéticas, numa gama de concentração que varia de 43% a 75%, sendo as sementes o componente mais rico nestes compostos (García-Lomillo e González-SanJosé, 2017). O bagaço contém proteínas, com teor a variar de 6% a 15% (em matéria seca), e embora a proporção nas cascas e nas sementes seja semelhante, as cascas das uvas são ligeiramente mais ricas nestas substâncias (García-Lomillo e González-SanJosé, 2017). O bagaço é também constituído por lípidos, sendo a maior contribuição dada pelas sementes das uvas, com um teor de 14% a 17% destas moléculas (García-Lomillo e González-SanJosé, 2017). A fração lipídica presente é rica em ácidos gordos insaturados, com baixos níveis de ácidos gordos saturados (Yi *et al.*, 2009). O bagaço contém ainda outras substâncias, como minerais e compostos fenólicos (Rockenbach *et al.*, 2012), tendo sido relatado que cerca de 70% dos compostos fenólicos das uvas permanece no bagaço após o processamento do vinho (Ratnasooriya e Rupasinghe, 2012). Em consequência disso e das propriedades dos compostos fenólicos, apresentadas na secção 2.2.1, a recuperação destes compostos a partir do BAUV tem ganho especial atenção.

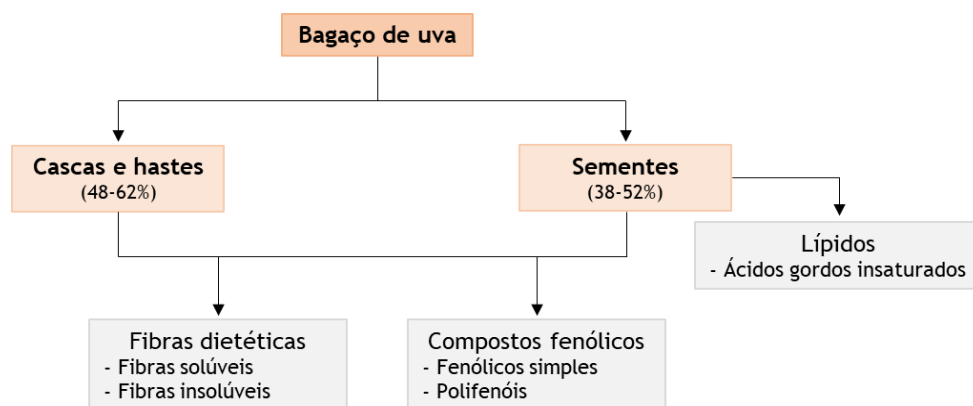


Figura 2 - Componentes do bagaço de uva e principais compostos obtidos a partir destes (adaptado de (Beres *et al.*, 2017)).

### 2.2.1 Constituintes fenólicos

Os compostos fenólicos correspondem a metabolitos secundários das plantas e representam um dos grupos de compostos naturais mais numerosos, importantes e amplamente distribuídos no reino vegetal (Fontana, Antonioli e Bottini, 2013; Beres *et al.*, 2017). Estes compostos estão, geralmente, relacionados com as respostas de defesa das plantas, desempenhando um papel importante no crescimento e na reprodução, além de contribuírem para a cor e características sensoriais dos frutos e vegetais (Balasundram, Sundram e Samman, 2006; Lin *et al.*, 2016). Quimicamente, os compostos fenólicos caracterizam-se por possuir um anel aromático, que pode conter um ou mais grupos hidroxilo, incluindo os seus derivados funcionais. Podem ser classificados como fenóis simples ou polifenóis, com base no número de unidades fenol existente na molécula (Khoddami, Wilkes e Roberts, 2013). Assim sendo, os compostos fenólicos são frequentemente organizados em classes e subclasses, tendo em conta as semelhanças das estruturas químicas (Figura 3).

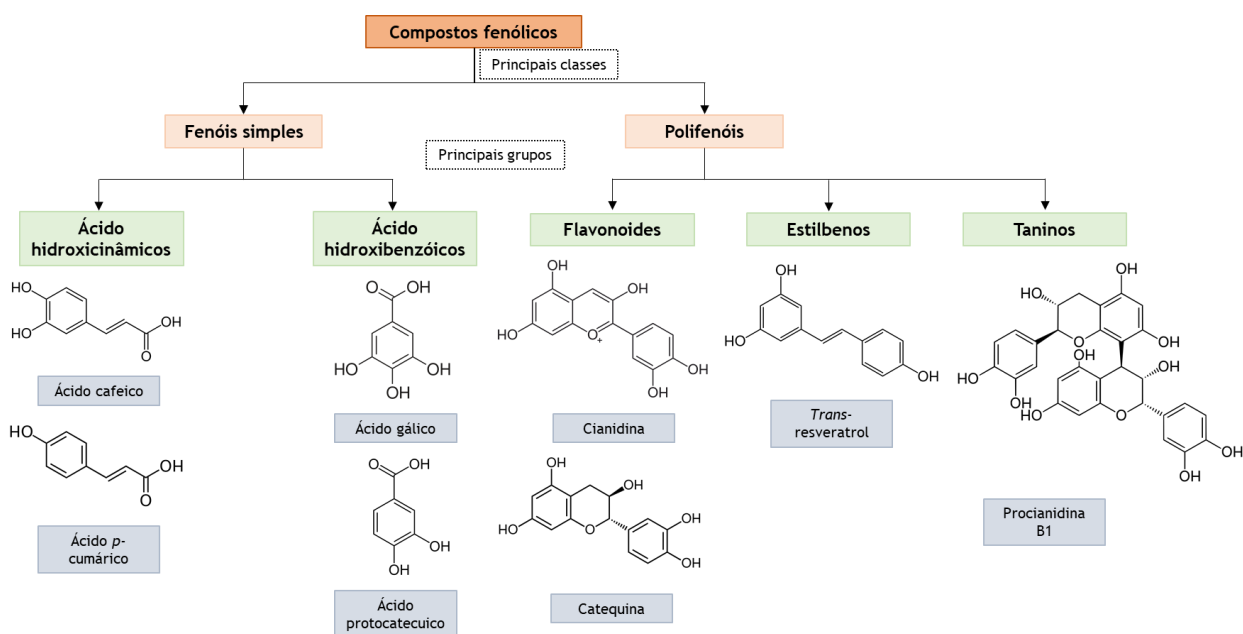
Os ácidos fenólicos, categorizados por serem compostos fenólicos simples, consistem em dois subgrupos: ácidos hidroxicinâmicos e ácidos hidroxibenzóicos. Os ácidos hidroxicinâmicos são compostos aromáticos com uma cadeia lateral de três carbonos ( $C_6-C_3$ ), sendo os ácidos cafeico e *p*-cumárico os mais comumente encontrados no BAUV, nomeadamente nas cascas. Por sua vez, os ácidos hidroxibenzóicos, como o ácido gálico e o ácido protocatecuico presentes principalmente nas sementes, têm uma estrutura comum de  $C_6-C_1$  (Balasundram, Sundram e Samman, 2006; García-Lomillo e González-SanJosé, 2017).

Os flavonoides correspondem a um extenso grupo de compostos fenólicos, constituídos por quinze átomos de carbono dispostos numa configuração de  $C_6-C_3-C_6$ . Incluem uma ampla gama de subgrupos, que diferem no grau de oxidação do heterociclo oxigenado. As antocianinas e os flavanóis são os subgrupos mais abundantes no BAUV, estando os restantes subgrupos presentes numa minoria. As antocianinas, de que é exemplo a cianidina, correspondem aos pigmentos característicos da cor vermelha, produzidos durante o amadurecimento das uvas (Beres *et al.*, 2017). Como consequência, as antocianinas apenas estão presentes no BAUV

vermelha, sendo que a ausência de antocianinas no BAUV branca faz com que os flavanois sejam o subgrupo mais abundante. Os flavanois, como a catequina, estão localizados principalmente nas sementes (García-Lomillo e González-SanJosé, 2017).

Os estilbenos estão presentes em tecidos vegetais não comestíveis e comestíveis, sendo as uvas e o vinho tinto duas das principais fontes alimentares destes compostos (Sun *et al.*, 2006). Um dos principais estilbenos encontrados nos resíduos de BAUV é o resveratrol (Beres *et al.*, 2017). A sua estrutura básica consiste em dois anéis fenólicos ligados entre si por uma ligação dupla, que é responsável pelas formas isoméricas *cis* e *trans* do resveratrol, sendo o isômero *trans* a forma natural mais estável que parece ser mais predominante (Gambini *et al.*, 2015).

Os taninos constituem também um grupo importante de compostos fenólicos encontrados no BAUV, uma vez que são responsáveis pela sensação de adstringência encontrada em certos vinhos (Soares, Mateus e Freitas, 2012; Ma *et al.*, 2014). Estes compostos têm peso molecular relativamente alto, sendo as procianidinas um exemplo deste grupo (Balasundram, Sundram e Samman, 2006).



**Figura 3** - Classificação dos compostos fenólicos e principais compostos encontrados no bagaço de uva (adaptado de (Beres *et al.*, 2017)).

As opiniões sobre os efeitos benéficos do vinho (e indiretamente do BAUV) começaram a surgir na década de 1990. Em 1992, Renaud e De Lorgeril, através de estudos epidemiológicos, criaram o *slogan* “*French paradox*”, que descreve a situação paradoxal da França, em que se observa uma reduzida prevalência de doenças cardíacas coronárias (DCC), apesar da alta ingestão de gorduras saturadas (Renaud e De Lorgeril, 1992). Investigações realizadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) confirmaram que a taxa de mortalidade por DCC é muito inferior na França relativamente a outros países, como os Estados Unidos da América e Reino

Unido (Renaud e De Lorgeril, 1992; Catalgol *et al.*, 2012). Os autores Renaud e De Lorgeril concluíram que o paradoxo pode ser causado pelo alto consumo de vinho na França, e estudos posteriores vieram a comprovar que os compostos fenólicos presentes no vinho estão implicados, nomeadamente no que diz respeito à atenuação da oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), reduzindo assim o risco de DCC (Frankel *et al.*, 1993; Teissedre *et al.*, 1996).

Os compostos fenólicos presentes no BAUV exibem, de facto, uma ampla gama de propriedades fisiológicas (Figura 4), como efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e antialérgicos (Balasundram, Sundram e Samman, 2006). As propriedades antioxidantes que, por definição, permitem o atraso ou a inibição da oxidação de substratos oxidáveis, contribuem também para os efeitos biológicos, nomeadamente ao nível da influência positiva na saúde cardiovascular e em certas formas de cancro (Boussetta *et al.*, 2011). Para além disso, estudos anteriores demonstraram a existência de atividade antimicrobiana contra várias bactérias, entre as quais, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (Jayaprakasha, Selvi e Sakariah, 2003; Baydar *et al.*, 2006). Os mecanismos de ação antimicrobiana dos compostos fenólicos ainda não estão totalmente compreendidos, no entanto, vários autores explicaram a sua ação pela modificação da permeabilidade das membranas celulares, pelas alterações em várias funções intracelulares induzidas pela ligação do hidrogénio dos compostos fenólicos às enzimas dos microrganismos, e ainda, pela modificação da rigidez da parede celular com perdas de integridade devido a diferentes interações com a membrana celular (Bouarab-Chibane *et al.*, 2019).

Uma pesquisa bibliográfica de Tournour *et al.* (2015) revelou que o número de publicações com as palavras-chave “antioxidante” e “bagaço de uva” aumentou nos últimos anos, enfatizando o crescente interesse pela temática. O BAUV é considerado uma fonte sustentável para a extração de compostos fenólicos, que podem ser recuperados como compostos funcionais para aplicação nas indústrias alimentar, cosmética e farmacêutica (Fontana, Antonioli e Bottini, 2013).

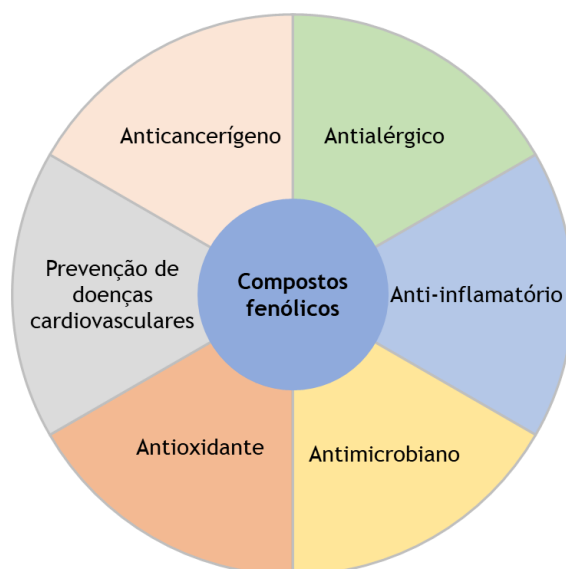


Figura 4 - Principais propriedades apresentadas pelos compostos fenólicos encontrados no bagaço de uva.

## 2.3 Extração dos compostos fenólicos do bagaço de uva

Neste contexto, a extração surge como um passo importante na recuperação dos compostos fenólicos presentes no BAUV (Ignat, Volf e Popa, 2011). Dado que não existe uma metodologia *standard*, a variabilidade de compostos fenólicos e o rendimento de extração dependem não só dos parâmetros inerentes ao cultivo das uvas, como localização geográfica, clima e condições do solo, como também da metodologia escolhida para a extração (Drevelegka e Goula, 2020).

### 2.3.1 Técnicas de extração de compostos fenólicos do bagaço de uva

Diferentes métodos de extração foram avaliados para a recuperação dos compostos fenólicos, ainda que se verifique que a extração convencional sólido-líquido seja o método mais relatado na literatura (Beres *et al.*, 2017; Etxabide *et al.*, 2018). Com a procura da utilização de técnicas sustentáveis e seguras, para fazer face a certas desvantagens dos métodos convencionais, surgiu a aplicação de novas técnicas, como a extração supercrítica, a extração por líquido pressurizado e a extração assistida por ultrassons ou micro-ondas (Etxabide *et al.*, 2018). Um grande número de estudos referentes à extração de compostos fenólicos do bagaço foi publicado, destacando-se alguns dos estudos na Tabela 1.

Tabela 1 - Exemplos de estudos da literatura sobre a extração de compostos fenólicos do bagaço de uva.

Método de extração	Variáveis de extração	Rendimento de extração (%)	Conteúdo fenólico total	Atividade antioxidante /Método	Referência
Sólido-líquido	Extração contínua; S=água; T=50 °C	-	-	-	(Pinelo, Del Fabbro, <i>et al.</i> , 2005)
	S=Etanol 96%; S/A=1 (V/m); t=90 min, T=50 °C	13,4	361,9 mg GAE/L	65,96% (percentagem de inibição - DPPH)	(Pinelo, Rubilar, <i>et al.</i> , 2005)
	S=Etanol 70%; S/A=10 (V/m); sonicação por 15 min; t=30 min; T <sub>amb</sub>	3	28 mg GAE/g bagaço em pó	-	(Yilmaz e Toledo, 2006)
	S=Etanol; S/A=4 (V/m); t=5 h; T=60 °C	-	~ 0,4 g GAE/100 g bagaço seco	-	(Spigno e De Faveri, 2007)
	S=Etanol 70%; S/A=4 (V/m); t=5 h; T=60 °C	7,38	47,1 g GAE/100 g extrato seco	44 % (percentagem de inibição - ABTS)	(Spigno, Tramelli e De Faveri, 2007)
Supercrítica	S=CO <sub>2</sub> com 8% de etanol como cossolvente; P=35 MPa; T=50 °C	28,9	388,6 mg GAE/L	73% (percentagem de inibição - DPPH)	(Pinelo <i>et al.</i> , 2007)
	S=CO <sub>2</sub> com etanol 15% (m/m) como cossolvente; P=15 MPa; T=40 °C	9,2	< LID	>250 µg/mL (IC <sub>50</sub> - DPPH)	(de Campos <i>et al.</i> , 2008)
	S=CO <sub>2</sub> com 5% de etanol como cossolvente; P=16,7 MPa; T=46 °C	12,32	2,52 mg GAE/mL	7,27 mg AAE/mL (método de formação do complexo fosfomolibdênio)	(Ghafoor, AL-Juhaimi e Choi, 2012)
Líquido pressurizado	S=Etanol 50%; P=9 MPa; T=120 °C	38	-	6 µg/mL (EC <sub>50</sub> - DPPH)	(Otero-Pareja <i>et al.</i> , 2015)
	S=Etanol 50%; P=10 MPa; T=100 °C	-	65,68 mg GAE/g bagaço seco	772,11 µmol ET/g bagaço seco (ORAC)	(Pereira <i>et al.</i> , 2019)
Assistida por ultrassons	S=Água; f=55 kHz; DPA=435 W/L; S/A= 20 (V/m); t=1 h; T=50 °C	-	770,9 mg GAE/100 g bagaço seco	705,9 mg ET/100 g bagaço seco (ABTS)	(González-Centeno <i>et al.</i> , 2015)
	S=Etanol 50%; f=20 kHz; S/A=8 (V/m); t=10 min; T=40 °C	-	33,88 mg GAE/g bagaço seco	-	(Drevelgka e Goula, 2020)
Assistida por micro-ondas	S=Etanol 50%; S/A=50 (V/m); Pot=200 W; t=1 h; T=50 °C	~ 20	231619 mg GAE/L extrato seco	0,32 mg/mL (IC <sub>50</sub> - DPPH)	(Drosou <i>et al.</i> , 2015)

**Nota:** S - solvente de extração; S/A - rácio solvente/amostra; t - tempo de extração; T - temperatura de extração; P - pressão; LID - limite inferior de deteção do método; T<sub>amb</sub> - temperatura ambiente; GAE - equivalentes de ácido gálico; ET - equivalentes de Trolox; AAE - equivalentes de ácido ascórbico; DPPH - ensaio de 2,2-difenil-1-picril-hidrazil; IC<sub>50</sub> - concentração de amostra necessária para diminuir em 50% a concentração inicial dos radicais DPPH; ORAC - capacidade de absorvância do radical de oxigénio; ABTS - ensaio do ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) ; EC<sub>50</sub> - concentração de amostra eficiente que fornece uma diminuição em 50% da concentração inicial dos radicais DPPH; f - frequência acústica; DPA - densidade de potência acústica; Pot - potência



## Extração sólido-líquido

A extração sólido-líquido (ESL) é um dos métodos mais simples para a extração dos compostos fenólicos do BAUV (Silva *et al.*, 2017). Este processo consiste num fenómeno de transferência de massa, no qual os compostos ativos contidos no bagaço migram para a fase do solvente que se encontra em contacto com a matriz (Ignat, Volf e Popa, 2011). A eficiência da extração é afetada por vários parâmetros, nomeadamente pelo tamanho das partículas da amostra de BAUV, o tipo de solvente, o rácio solvente/amostra, assim como pela temperatura e pelo tempo de extração (Drevelegka e Goula, 2020).

Pinelo, Del Fabbro, *et al.* (2005), estudaram o efeito do tamanho das partículas de BAUV (entre 0,5 e 5,5 mm) na eficiência da extração e concluíram que uma maior quantidade de compostos fenólicos foi obtida com um tamanho de partícula mais reduzido. A redução do tamanho das partículas da amostra inicial aumenta a área superficial disponível para a transferência de massa, melhorando a penetração do solvente e difusão dos solutos.

O tipo de solvente de extração a utilizar é de facto um dos fatores mais relevantes para o processo de extração, sendo, por isso, um dos parâmetros mais estudados (Beres *et al.*, 2017). Pinelo, Rubilar, *et al.* (2005), avaliaram o efeito de diferentes solventes de extração no conteúdo fenólico total e na atividade antioxidante dos extratos. Embora se tenha verificado que o etanol extrai mais compostos solúveis, o metanol foi o mais seletivo para a extração dos compostos fenólicos. Por sua vez, Spigno e De Faveri (2007), testaram etanol e a mistura acetato de etilo/água (9:1) como solventes de extração, e concluíram que o etanol permitia rendimentos mais elevados, ainda que, com menor pureza. A seletividade e a solubilidade dos compostos de interesse no solvente são fatores a serem considerados na seleção do solvente de extração (Zhang, Lin e Ye, 2018). Devido à natureza relativamente polar dos compostos fenólicos, estes são facilmente solubilizados em meios próticos polares, como soluções hidroalcoólicas (Fontana, Antonioli e Bottini, 2013). Yilmaz e Toledo (2006) relataram que soluções aquosas de etanol, metanol e acetona eram mais eficientes na extração do que sistemas de solvente de mono-componente. Para além disso, também devem ser considerados na seleção do solvente, fatores como o custo e a toxicidade do solvente (Zhang, Lin e Ye, 2018). O etanol é um solvente barato, geralmente reconhecido como seguro (GRAS) de acordo com a definição da *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) (Fontana, Antonioli e Bottini, 2013) e, de acordo com a Diretiva 2009/32/CE, é considerado um solvente de extração a utilizar em conformidade com as boas práticas de fabricação (CE, 2009). Assim, pelas razões referidas e devido à sua presença natural nos vinhos, o etanol é considerado uma boa escolha comparativamente a outros solventes orgânicos, como o metanol, tendo em consideração a aplicação alimentar dos extratos obtidos. Para além disso, as características físico-químicas do etanol, como o relativamente baixo ponto de ebulição, facilitam as operações de recuperação do solvente, com um menor custo de energia associado (Tournour *et al.*, 2015). O estudo de Spigno, Tramelli e Faveri (2007) permitiu concluir que a percentagem de etanol de 70% permitia

obter um rendimento de compostos fenólicos superior, comparativamente a outras proporções de etanol.

O efeito do rácio solvente/amostra foi investigado por Pinelo, Del Fabbro, *et al.* (2005) e constataram que com o aumento do rácio, maior era o rendimento de extração, o que era consistente com os princípios de transferência de massa. Contudo, é necessário mais tempo para a evaporação do solvente (concentração do extrato) (Zhang, Lin e Ye, 2018). O tempo e a temperatura de extração também são parâmetros importantes a serem otimizados, nomeadamente para minimizar o custo energético do processo (Spigno, Tramelli e De Faveri, 2007). De acordo com a literatura, um aumento de temperatura favorece a extração, aumentando a solubilidade do soluto e o coeficiente de difusão; contudo, a partir de um valor limite de temperatura, os compostos fenólicos podem ser degradados (Pinelo, Rubilar, *et al.*, 2005; Spigno e De Faveri, 2007; Spigno, Tramelli e De Faveri, 2007). Spigno, Tramelli e Faveri (2007) relataram que, do ponto de vista prático e económico, é preferível trabalhar a 60 °C por curtos períodos (preferencialmente < 8 h) do que trabalhar a 45 °C por períodos mais longos.

### **Extração supercrítica**

A extração supercrítica (ESC) representa uma alternativa ambientalmente sustentável à extração convencional por solventes orgânicos. É um método caracterizado por ser rápido, automatizável, seletivo e com reduzida exposição à luz e ao ar (o que reduz os processos de degradação) (Ignat, Volf e Popa, 2011). A principal desvantagem desta abordagem está relacionada com o elevado investimento necessário para o equipamento e instalação (Ajila *et al.*, 2011).

A ESC usa como solvente um fluido supercrítico, que consiste em qualquer substância cuja temperatura e pressão sejam superiores aos seus valores críticos e cujas propriedades físico-químicas assumam valores intermédios aos característicos dos líquidos e dos gases. Para além de uma boa capacidade de dissolução (devido à densidade ser próxima da dos líquidos), os fluidos supercríticos possuem valores relativamente elevados de coeficientes de difusão e valores baixos de viscosidade (à semelhança dos gases) (Barbosa, 2015). Estas características conferem aos fluidos supercríticos boas propriedades de transferência de massa na fase supercrítica, em particular em matrizes sólidas porosas, permitindo obter uma extração rápida e eficiente. O dióxido de carbono é o fluido mais utilizado na extração de compostos fenólicos do bagaço, devido às suas características particulares, nomeadamente os seus valores moderados de pressão e temperatura crítica, que são fáceis de alcançar do ponto de vista tecnológico e que não comprometem a estabilidade dos compostos fenólicos (Fontana, Antonioli e Bottini, 2013; Barbosa, 2015). O dióxido de carbono não é tóxico, nem inflamável, é relativamente barato e não deixa vestígios de solvente no produto extraído (Mohamed *et al.*, 2016). De acordo com a Diretiva 2009/32/CE, o dióxido de carbono pode ser usado como

solvente de extração em conformidade com as práticas de fabricação, durante o processamento de matérias-primas, alimentos, componentes ou ingredientes alimentares (CE, 2009).

O dióxido de carbono supercrítico (S-CO<sub>2</sub>) apresenta baixa polaridade, sendo, por isso, mais adequado para a extração de compostos hidrofóbicos (Zhang, Lin e Ye, 2018). Contudo, é comum recorrer ao uso de cossolventes, que são tipicamente compostos polares (como por exemplo, o etanol), para alterar a polaridade do S-CO<sub>2</sub> puro e, assim, melhorar a solubilização e a seletividade do processo de extração (Barbosa, 2015; da Silva, Rocha-Santos e Duarte, 2016).

Pinelo *et al.* (2007) realizaram um estudo comparativo entre a ESL e a ESC e concluíram que, de uma maneira geral, os extratos obtidos por ESC apresentam maior concentração fenólica total e atividade antioxidante, relativamente aos extratos provenientes da ESL. Estudaram ainda o efeito da adição de etanol a uma concentração de 8%, como cossolvente na ESC, tendo verificado um aumento do rendimento de extração, assim como dos valores de concentração fenólica e da atividade antioxidante, devido ao aumento da polaridade do solvente. O efeito da concentração de etanol (10, 15 e 20% m/m) foi avaliado em relação ao potencial antioxidante dos extratos de BAUV, por De Campos *et al.* (2008), e os resultados mostraram que a adição de etanol aumenta o rendimento de extração, atingindo um máximo para a concentração de 15%. Verificaram que concentrações superiores a 15% de etanol diminuem o rendimento do processo, uma vez que não há energia suficiente para separar as moléculas de etanol, o que se traduz numa redução de moléculas de soluto a serem solubilizadas. No entanto, a atividade antioxidante e o conteúdo fenólico total dos extratos obtidos foram consideravelmente inferiores aos alcançados pelo uso de outros métodos de extração também testados pelos autores (nomeadamente a ESL). O ESC apresentou melhores resultados para a extração de compostos não polares, como ácidos gordos, e foi capaz de extrair compostos não detetados nos extratos obtidos por métodos convencionais, como o ácido oleico e o fitol.

Ghafoor, Al-Juhaimi e Choi (2012) relataram também que a pressão do CO<sub>2</sub> e a temperatura de extração são variáveis importantes no processo de ESC, sendo que um aumento destas variáveis até certos valores limite (tendo em conta a baixa estabilidade dos compostos fenólicos), corresponde a um aumento do rendimento de extração, do conteúdo fenólico total e da atividade antioxidante.

### **Extração por líquido pressurizado**

A extração por líquido pressurizado (ELP), também conhecida como extração acelerada por solvente, utiliza solventes convencionais a temperaturas elevadas (100-180 °C) e a altas pressões (até 20 MPa) (Fontana, Antonioli e Bottini, 2013; Beres *et al.*, 2017), permitindo uma extração mais rápida e com baixo consumo de solvente (Silva *et al.*, 2017). Sob altas pressões, o ponto de ebulição do solvente aumenta, permitindo que a extração se realize a temperaturas

mais elevadas. Por sua vez, o uso de temperaturas elevadas promove um aumento da capacidade de o solvente solubilizar os analitos, uma transferência de massa mais rápida e um enfraquecimento das interações soluto-matriz (Sarker e Nahar, 2012). Além disso, a viscosidade do solvente e a tensão superficial diminuem com o aumento da temperatura, o que significa que o solvente consegue penetrar na matriz mais facilmente (Wijngaard *et al.*, 2012; Fontana, Antonioli e Bottini, 2013). O uso de altas pressões aumenta a extração de analitos confinados nos poros da matriz, uma vez que a pressão força o solvente a penetrar em áreas mais profundas da matriz da amostra, o que não aconteceria ao usar condições atmosféricas (Richter *et al.*, 1996). Apesar das vantagens do método, é de notar que o uso de temperaturas elevadas pode causar a degradação dos compostos fenólicos, o que constitui uma limitação à utilização do método (Ajila *et al.*, 2011).

Otero-Pareja *et al.* (2015) avaliaram o efeito de diferentes parâmetros experimentais, como o solvente de extração, a pressão e a temperatura, na ELP de compostos fenólicos do BAUV. Os autores constataram que o solvente etanol/água (50:50) foi o sistema de solvente mais adequado, comparativamente ao etanol puro e à água, e verificaram ainda, através de uma análise estatística de variância, que a temperatura tem muito mais influência no rendimento da extração do que a pressão. Pereira *et al.* (2019) reportaram que o solvente etanol/água (50% m/m) a uma temperatura de 100 °C e à pressão de 10 MPa otimiza a extração dos compostos fenólicos, com extratos a apresentarem elevada capacidade antioxidante.

### **Extração assistida por ultrassons**

A extração assistida por ultrassons (EAU) é uma abordagem sustentável e promissora face aos métodos convencionais, dada a sua simplicidade, eficácia, segurança e baixo investimento em comparação com outras técnicas (Carrera *et al.*, 2012; Tao, Zhang e Sun, 2014). Os ultrassons consistem em ondas mecânicas que, quando propagadas em meio líquido, geram um fenómeno de cavitação, que constitui a base do processo de extração (Tao, Zhang e Sun, 2014). O colapso das bolhas de cavitação durante o ciclo de compressão tem como consequência a criação de microjatos de líquido em direção à superfície da matriz da amostra, e o aumento da temperatura e da pressão, o que facilita a destruição da superfície da matriz, permitindo a libertação do conteúdo para o meio (Rostagno e Prado, 2013). Desta forma, a penetração do solvente de extração na matriz da amostra é favorecida, assim como, a transferência de massa entre a matriz e a fase líquida (Fontana, Antonioli e Bottini, 2013).

González-Centeno *et al.* (2015) verificaram que o processo de EAU exigiu menos tempo de extração e temperaturas operacionais mais baixas para a obtenção de extratos com características fenólicas e antioxidantes semelhantes às resultantes da extração convencional. Drevelegka e Goula (2020) analisaram a influência do tempo e da temperatura de extração, do rácio solvente/amostra, do tipo de solvente e do nível de amplitude das ondas ultrassónicas. Destacando a influência do tempo de extração, os autores constataram que o rendimento de

extração aumentou entre o período de 2 a 20 min, diminuindo posteriormente. Isto deve-se ao facto de que à medida que as paredes celulares do BAUV se rompem, mais impurezas ficam suspensas no extrato, diminuindo a permeabilidade do solvente nas estruturas celulares. Além disso, os compostos de interesse também podem reabsorver nas partículas de tecido rompidas, devido às suas áreas de superfície específicas relativamente grandes.

Apesar da ampla utilização deste método, a EAU apresenta desvantagens, entre elas, a falta de uniformidade na distribuição da energia dos ultrassons, a diminuição da potência com o tempo e o aumento de temperatura que pode comprometer a estabilidade dos compostos de interesse (Ajila *et al.*, 2011).

### **Extração assistida por micro-ondas**

A extração assistida por micro-ondas (EAM) representa outra opção adequada para a extração de compostos fenólicos, já que apresenta tempos de extração reduzidos, baixo consumo de solvente e boa reprodutibilidade (Silva *et al.*, 2017). As micro-ondas são ondas eletromagnéticas não ionizantes de frequência entre 300 MHz e 300 GHz, capazes de provocar efeitos diretos nas moléculas da matriz sólida e do solvente, com conseqüente aumento da temperatura (Ajila *et al.*, 2011; Rostagno e Prado, 2013). A transformação da energia eletromagnética em calor ocorre por dois mecanismos: condução iónica e rotação de dipolos; na maioria dos casos, ambos os fenómenos ocorrem em simultâneo (Routray e Orsat, 2012; Sarker e Nahar, 2012). A resistência da solução à migração de iões, resultado da condução iónica, gera fricção, a qual provoca o aumento da temperatura da solução (Sarker e Nahar, 2012). Por outro lado, a rotação dos dipolos está relacionada com o movimento alternativo de moléculas polares que possuem momentos dipolares (permanentes ou induzidos pelo campo eléctrico), que tentam alinhar-se com o campo eléctrico. À medida que o campo diminui, a desordem térmica é restaurada, o que resulta na libertação de energia térmica (Rostagno e Prado, 2013). Por conseguinte, o aumento da temperatura permite acelerar o processo de extração e melhorar o rendimento (Zhang, Lin e Ye, 2018). No entanto, o aumento da temperatura pode comprometer a estabilidade dos compostos termossensíveis (Silva *et al.*, 2017). Para além disso, outra desvantagem da EAM refere-se aos elevados custos associados ao método (Ajila *et al.*, 2011).

Um estudo comparativo entre a EAU e a EAM de compostos fenólicos de BAUV foi realizado por Drosou *et al.* (2015). Os autores verificaram que a EAM obteve rendimentos de extração superiores relativamente à EAU, ainda que ambas tenham obtido extratos com elevada atividade antioxidante.

Para a seleção do método de extração dos compostos fenólicos destinados a serem microencapsulados e incorporados em matrizes alimentares, deve considerar-se se o pretendido é a recuperação de compostos fenólicos lipofílicos e/ou hidrofílicos, se o solvente ou a mistura

de solventes é considerado GRAS, a quantidade de solvente necessária para a extração, o tempo e temperatura de extração, o consumo de energia e os custos associados (Paulo e Santos, 2020a). Além disso, outro dos critérios para a escolha do método de extração, no contexto do presente projeto, é referente ao material e ao equipamento disponível no laboratório E201 do LEPABE. Considerando que a ESC e EAM têm elevados custos de equipamento e de instalação, e que a ELP, EAU e EAM operam a temperaturas elevadas, a ESL surge como uma boa opção para a extração dos compostos fenólicos do BAUV. A simplicidade do protocolo e a não necessidade de um equipamento específico, associada ao facto de este ser um método que não precisa de utilizar temperaturas elevadas que possam comprometer a estabilidade dos compostos fenólicos, suportam a escolha do método de ESL. O esquema proposto para a extração dos compostos fenólicos do BAUV está apresentado na Figura 5 e a descrição mais detalhada encontra-se no Anexo A - Método para a extração dos compostos fenólicos do bagaço de uva.

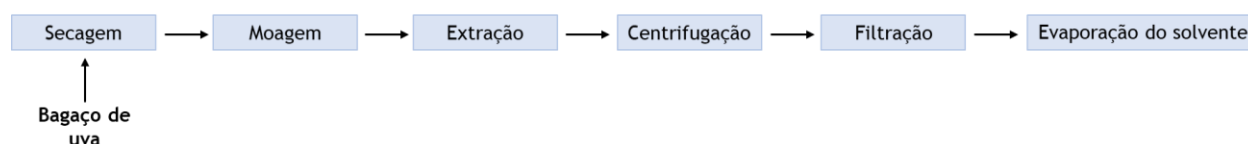


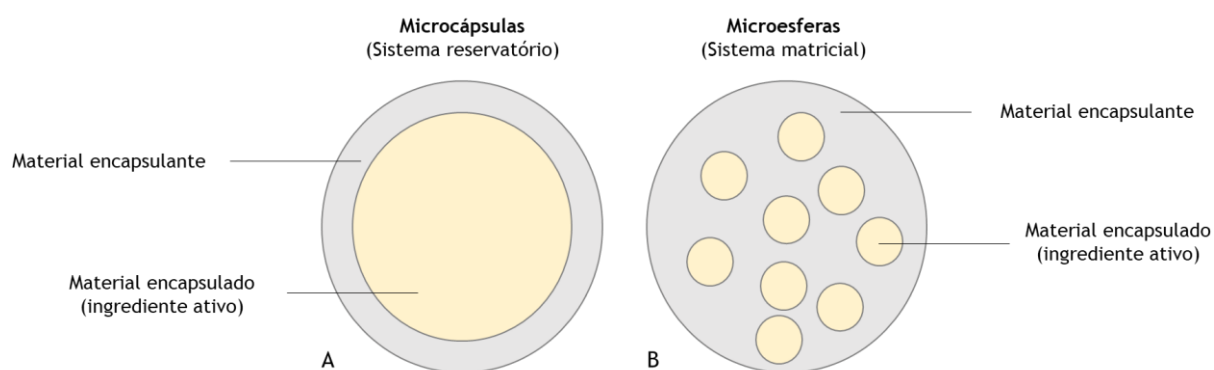
Figura 5 - Representação esquemática dos principais passos para a extração dos compostos fenólicos do bagaço de uva pela técnica de extração sólido-líquido.

As características que tornam os compostos fenólicos extraídos do BAUV tão atraentes, são também responsáveis pelas suas limitações quando aplicados na indústria alimentar, uma vez que estes têm tendência a serem degradados por serem facilmente oxidados e por apresentarem baixa estabilidade a fatores ambientais, tais como luz, oxigénio, temperatura, pH e atividades enzimáticas. A baixa estabilidade durante o processamento, distribuição ou armazenamento dos produtos alimentares ou no trato gastrointestinal, depois de ingeridos, limita a atividade dos compostos fenólicos e os potenciais benefícios para a saúde humana. Além disso, muitos compostos fenólicos apresentam baixa solubilidade em água e sabores desagradáveis, os quais devem ser mascarados antes da incorporação em matrizes alimentares. A microencapsulação é uma das abordagens utilizadas para a proteção e estabilidade dos extratos ricos em compostos fenólicos de BAUV, para além de permitir a libertação controlada dos compostos bioativos (Tsali e Goula, 2018).

## 2.4 Microencapsulação de extratos ricos em compostos fenólicos obtidos a partir de bagaço de uva

A microencapsulação é definida como um conjunto de técnicas que permite que compostos sólidos, líquidos ou gasosos, sejam envolvidos por um revestimento polimérico ou

embebidos numa matriz polimérica (Carvalho, Estevinho e Santos, 2016; Paulo e Santos, 2018b). O composto ou extrato bioativo revestido é denominado como núcleo, material encapsulado ou fase interna, e o material usado para fins de revestimento é denominado como parede, material/agente encapsulante ou fase externa (Fang e Bhandari, 2010). Considerando o tamanho das partículas obtidas pela encapsulação, estas podem ser classificadas como: macropartículas (>5000  $\mu\text{m}$ ), micropartículas (1-5000  $\mu\text{m}$ ) e nanopartículas (<1  $\mu\text{m}$ ) (Aguiar, Estevinho e Santos, 2016). As partículas também podem ser distinguidas de acordo com a morfologia apresentada. Embora muitas morfologias possam ser produzidas, duas são mais frequentemente encontradas: microcápsulas e microesferas (Figura 6). No caso das microcápsulas, estas funcionam como um reservatório, no qual o composto ativo está no interior e é revestido por uma parede polimérica de forma circundante; as microesferas funcionam como um sistema matricial, em que o composto ativo está disperso no material encapsulante (Fang e Bhandari, 2010).



**Figura 6** - Principais morfologias encontradas em partículas obtidas por microencapsulação: (A) microcápsulas e (B) microesferas (adaptado de (Fang e Bhandari, 2010)).

A abordagem tecnológica da microencapsulação foi investigada pelas indústrias farmacêutica, alimentar, cosmética, têxtil, biomédica, agrícola e eletrônica. A indústria alimentar é o segundo principal impulsionador do progresso da microencapsulação, motivada pela exigência crescente dos consumidores e procura por produtos fortificados e funcionais (Paulo e Santos, 2017). Uma vez que, de uma forma geral, os ingredientes funcionais adicionados ao produto final são ambientalmente e/ou de processamento instável, a microencapsulação é uma estratégia promissora, no sentido de permitir a proteção do material do núcleo de condições adversas, evitando a sua degradação e permitindo a sua estabilidade e biodisponibilidade. Adicionalmente, a microencapsulação pode ser aplicada para: (i) reduzir a evaporação ou a taxa de transferência do material do núcleo para o ambiente externo; (ii) mascarar sabores, odores e cores indesejáveis do material do núcleo; (iii) modificar as propriedades físico-químicas do material original para facilitar o manuseio; (iv) prevenir reações e interações indesejáveis entre os ingredientes ativos e os outros ingredientes

presentes na formulação e (v) controlar a taxa de libertação do material do núcleo sob condições desejadas (Fang e Bhandari, 2010; Gaonkar *et al.*, 2014).

#### 2.4.1 Agentes encapsulantes

O tipo de agente encapsulante é uma questão fundamental que contribui para o mecanismo de libertação dos compostos bioativos. A sua seleção deve ser baseada no procedimento e na finalidade da microencapsulação, na eficiência de encapsulação, no tipo de libertação pretendido, bem como na relação custo-benefício do material (Hosseini, Tajiani e Jafari, 2019). Para além disso, o agente encapsulante deve atender aos padrões de segurança para aplicação alimentar emitidos por organizações governamentais, como a FDA ou a *European Food Safety Authority* (EFSA) (Đorđević *et al.*, 2016; Hosseini, Tajiani e Jafari, 2019). Do ponto de vista funcional, o agente encapsulante deve ser compatível com o material do núcleo; deve ser capaz de formar um filme coeso com o material do núcleo e permitir a estabilização deste; deve fornecer propriedades de revestimento específicas, como estabilidade, resistência e flexibilidade; deve ser inerte relativamente aos compostos ativos e compatível com a destinação final, permitindo a libertação controlada sob condições desejadas (Aguiar, Estevinho e Santos, 2016).

Os agentes encapsulantes mais utilizados no setor alimentar são os polissacarídeos, que incluem o amido e derivados (maltodextrina, polidextrose), celulosas e derivados (carboximetilcelulose, metilcelulose, etilcelulose) e gomas (goma arábica, alginato de sódio). As proteínas alimentares, nomeadamente as proteínas de soja e de leite, e uma ampla gama de lípidos são também usados como materiais encapsulantes (Đorđević *et al.*, 2016).

No contexto do presente projeto, a etilcelulose (EC) assume especial destaque (Figura 7). A EC é um polímero biocompatível derivado da celulose, no qual alguns grupos hidroxilo foram substituídos por grupos etoxi (Paulo e Santos, 2018b). Possui propriedades úteis à microencapsulação aplicada à área alimentar, como o facto de ser insípido e inodoro, não irritante e não tóxico, e estável à luz, ao calor e ao oxigénio, sendo também resistente ao stress mecânico (Murtaza, 2012). Além disso, a EC é solúvel em solventes orgânicos, como álcoois, cetonas e ésteres, e insolúvel em soluções aquosas; contudo, pode absorver água, devido ao seu potencial para formar ligações de hidrogénio com a água, o que pode ser fundamental para a libertação dos compostos ativos (Murtaza, 2012). Segundo a FDA, a EC foi aprovada como um aditivo alimentar GRAS, permitido para adição direta em alimentos para consumo humano. Em produtos láteos deve ser adicionada em níveis que variem entre 0,0075 e 5%, estimando-se que o uso pretendido de EC na categoria mencionada resulte numa ingestão média de 4,95 g/dia, sendo a ingestão máxima permitida de aproximadamente 9,90 g/dia (FDA, 2013).



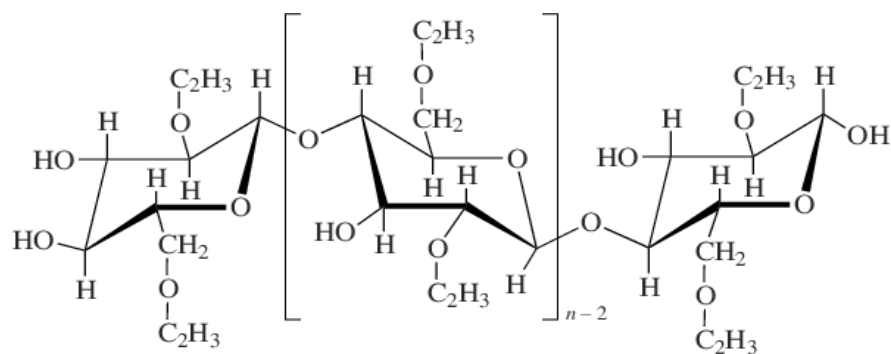


Figura 7 - Estrutura química da etilcelulose.

#### 2.4.2 Técnicas de microencapsulação de extratos ricos em compostos fenólicos obtidos a partir de bagaço de uva

Várias técnicas de microencapsulação têm sido estudadas considerando alguns fatores importantes, como (i) as propriedades físico-químicas do material do núcleo, (ii) as propriedades físico-químicas do material encapsulante e (iii) a aplicação final pretendida para as micropartículas obtidas - sendo que não existe uma técnica de microencapsulação ajustável a todos os materiais do núcleo, polímeros e aplicações (Paulo e Santos, 2020a). As técnicas mais utilizadas para a microencapsulação de extratos ricos em compostos fenólicos de BAUV, para aplicação no setor alimentar, são a coacervação, *freeze drying*, *spray drying* e a emulsão. Alguns dos estudos encontrados estão apresentados na Tabela 2. Uma vez que estão disponíveis na literatura revisões abrangentes das técnicas referidas (Fang e Bhandari, 2010; Ozkan *et al.*, 2019) e que o grupo de investigação no qual se insere o presente projeto prioriza a técnica de *spray drying*, amplamente aplicada na indústria, e a técnica de emulsão, mais especificamente a dupla emulsão por evaporação de solvente, apenas estas serão descritas.

Tabela 2 - Exemplos de estudos da literatura sobre a microencapsulação de extratos ricos em compostos fenólicos do bagaço de uva.

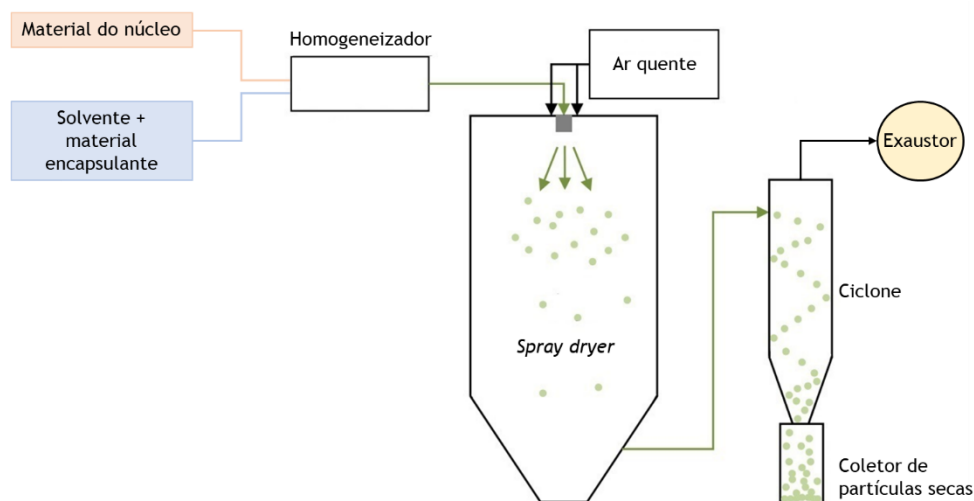
Método de microencapsulação	Agente encapsulante	EE (%)	RP (%)	Tamanho da micropartícula (µm)	Referência
Coacervação	Proteína isolada de soro de leite (5% m/V) e goma arábica (2% m/V) (1:1)	99,65	-	37,82-58,91	(Stănciuc <i>et al.</i> , 2017)
Freeze drying	Maltodextrina e goma arábica (1:1)	89,61	-	-	(Stoll <i>et al.</i> , 2016)
	Polidextrose (5% m/V) e goma de guar parcialmente hidrolisada (5% m/V)	-	-	-	(Kuck, Wesolowski e Noreña, 2017)
	Goma de mesquita e zeína (44%:56%)	-	-	-	(Davidov-Pardo <i>et al.</i> , 2012)
Spray drying	Maltodextrina e zeína (44%:56%)	84,6	-	6,6	(Davidov-Pardo, Arozarena e Marín-Arroyo, 2013)
	Proteína isolada de ervilha	-	-	22,3	(Moreno <i>et al.</i> , 2016)
	Maltodextrina e goma arábica (8:2 V/V)	98,8	59,5	1-10	(Tolun, Altintas e Artik, 2016)
	Goma arábica	85,2	65,9	5,6	(Kalušević <i>et al.</i> , 2017)
	Proteína isolada de soro de leite	-	77,6	15	(Moreno, Cocero e Rodríguez-Rojo, 2018)
	Maltodextrina e proteína isolada de soro de leite (1:1)	89,9	20,14	-	(Tsali e Goula, 2018)
	Proteína isolada de soro de leite e goma arábica	-	31	-	(da Rocha e Noreña, 2020)
	Emulsão O1/A	Maltodextrina (10%) e concentrado de proteína de soro de leite (10%) (4:6)	95,28	-	1,1
Emulsão A1/O/A2 por evaporação de solvente	Óleo de girassol e polirricinoleato de poliglicerol (4% m/m)	78,6	-	9	(Estévez <i>et al.</i> , 2019)

Nota: O1/A - óleo em água; A1/O/A2 - água em óleo em água; EE - eficiência de encapsulação; RP - rendimento do produto

### ***Spray drying***

A técnica de *spray drying* é amplamente aplicada na indústria alimentar (Fang e Bhandari, 2010) e tem sido a mais utilizada para a microencapsulação de extratos ricos em compostos fenólicos de BAUV. Consiste num processo de atomização de um líquido em pó seco, pelo uso de um injetor e de uma câmara de secagem, e compreende 3 etapas: (i) homogeneização do material do núcleo com o material encapsulante; (ii) injeção da mistura num *spray dryer* e atomização com recurso a um *nozzle* ou a um *spinning wheel* numa câmara quente, onde a evaporação rápida do solvente ocorre sob ação de uma corrente de ar quente; e (iii) recuperação das partículas secas através de um ciclone ou filtro (Figura 8) (Fang e Bhandari, 2010; Ozkan *et al.*, 2019). As características do pó obtido estão relacionadas em grande parte com as condições operacionais, como a taxa de fluxo da solução de alimentação (que inclui o material do núcleo e o material encapsulante), a temperatura de secagem, a taxa de fluxo do ar de secagem, a velocidade do atomizador e o tipo e concentração do agente encapsulante (Ozkan *et al.*, 2019).

O *spray drying* é vantajoso dada a simplicidade, flexibilidade e rapidez do processo, o custo relativamente baixo e o fácil *scale-up*. Esta técnica permite uma produção em larga escala em modo contínuo, com alta eficiência de encapsulamento e elevada estabilidade do produto final (Carvalho, Estevinho e Santos, 2016). Contudo, existem vários fatores limitantes. Um deles é referente ao número restrito de materiais encapsulantes disponível, já que o material encapsulante selecionado deve ser solúvel em água (Đorđević *et al.*, 2016). Também as elevadas temperaturas de operação são uma desvantagem do processo, uma vez que podem comprometer a estabilidade dos compostos ativos mais termossensíveis (Fang e Bhandari, 2010). Neste sentido, a temperatura de entrada do ar de secagem é uma das variáveis do processo mais estudadas (Moreno *et al.*, 2016; Tolun, Altintas e Artik, 2016; Tsali e Goula, 2018). Tolun, Altintas e Artik (2016) investigaram o uso de diferentes temperaturas de entrada do ar de secagem (120 °C, 140 °C, 160 °C e 180 °C) e constataram que o rendimento do processo aumentou com o aumento da temperatura, o que pode ser atribuído à maior eficiência dos processos de transferência de calor e de massa. Contudo, verificaram que para temperaturas mais elevadas (160 °C e 180 °C) ocorre degradação térmica dos compostos fenólicos e consequente redução da atividade antioxidante.



**Figura 8** - Esquema representativo da técnica de spray drying (adaptado de (Rigobelo, 2012)), com as etapas principais: homogeneização do material do núcleo com o material encapsulante; atomização da mistura no *spray dryer* e recuperação das micropartículas através do ciclone.

O tipo de agente encapsulante e o rácio agente encapsulante/extrato também têm sido alvo de estudo na microencapsulação de extratos ricos em compostos fenólicos de BAUV (Davidov-Pardo *et al.*, 2012; Moreno *et al.*, 2016; Tolun, Altintas e Artik, 2016; Kalušević *et al.*, 2017; Moreno, Cocero e Rodríguez-Rojo, 2018). Moreno *et al.* (2016) investigaram o uso de três agentes encapsulantes diferentes (maltodextrina (MD), proteína isolada de soro de leite (PISL) e proteína isolada de ervilha (PIE)) e a utilização de rácios agente encapsulante/extrato inferiores ao rácio geralmente utilizado na indústria alimentar (4:1 m/m), com o objetivo de aumentar a concentração de compostos bioativos no produto final. Verificaram que a utilização de PISL e PIE permitiu obter micropartículas com um teor fenólico total superior ao obtido com a utilização de MD, sendo que as micropartículas obtidas com o menor rácio agente encapsulante/extrato testado (0,1:1 m/m) foram as que apresentaram maior teor fenólico por grama de produto. Num trabalho posterior, Moreno *et al.* (2018) compararam a eficiência dos três agentes encapsulantes em termos de estabilidade de armazenamento das micropartículas a curto e longo prazo, e de libertação dos compostos fenólicos em fluidos gástricos e intestinais simulados. Os resultados mostram que a PISL e a PIE são alternativas interessantes à MD, frequentemente usada, sendo que cada uma das proteínas estudadas oferece vantagens específicas. Destaca-se, por exemplo, o facto das micropartículas elaboradas com PISL permitirem uma libertação mais lenta e controlada dos compostos fenólicos, tanto no fluido simulado gástrico quanto intestinal, contrariamente às micropartículas de PIE que apresentam uma libertação quase instantânea. Quanto à estabilidade, as micropartículas de PISL ofereceram baixa estabilidade a curto e longo prazo, e devem apenas ser consideradas para produtos destinados ao uso imediato; as micropartículas de PIE apresentaram excelente estabilidade, podendo ser consideradas quando for necessário um longo prazo de validade do produto. Além disso, a exposição das micropartículas a condições normais, com e sem luz,

durante 6 meses de armazenamento, não teve efeitos significativos na estabilidade fenólica e na atividade antioxidante, para qualquer um dos agentes encapsulantes testados.

### Dupla emulsão por evaporação de solvente

Ainda que existam poucos trabalhos na literatura a utilizar esta técnica para microencapsular extratos ricos em compostos fenólicos de BAUV, a dupla emulsão por evaporação de solvente tem sido alvo de um crescente interesse por parte da indústria alimentar (Bonnet *et al.*, 2009; Sapei, Naqvi e Rousseau, 2012; Li *et al.*, 2014). Esta técnica permite o encapsulamento de moléculas hidrofílicas e hidrofóbicas, de acordo com o tipo de emulsão escolhido - emulsão água em óleo em água (A1/O/A2) ou emulsão óleo em água em óleo (O1/A/O2), respetivamente (Paulo e Santos, 2018b). O sistema de emulsão A1/O/A2 é o mais utilizado, sendo o composto ativo dissolvido na fase aquosa interna (A1) e o agente encapsulante dissolvido num solvente orgânico (O). Esta técnica integra quatro etapas fundamentais: (i) mistura das fases aquosa interna e orgânica, geralmente por agitação, para dar origem à emulsão água em óleo (A1/O) simples; (ii) dispersão da emulsão primária A1/O numa fase aquosa contendo um surfactante (emulsificante) (fase aquosa externa (A2)), para originar a emulsão dupla A1/O/A2; (iii) evaporação do solvente orgânico e (iv) recuperação das micropartículas por filtração. As micropartículas obtidas são subsequentemente secas (Iqbal *et al.*, 2015; Paulo e Santos, 2018b). Existem variáveis que podem afetar o processo de microencapsulação, tais como a natureza e volume do solvente, concentração do agente encapsulante, tipo e concentração do surfactante, taxa de remoção do solvente, velocidade de agitação, temperatura, entre outros (Ozkan *et al.*, 2019).

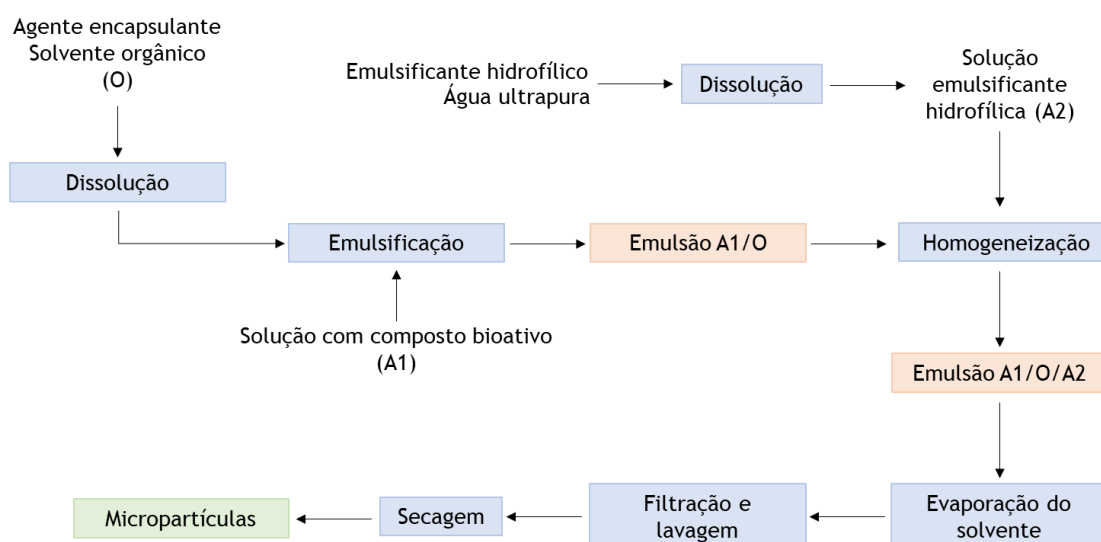
A presença de dois domínios aquosos separados por uma camada de óleo, permite à fase aquosa interna oferecer grande potencial para o encapsulamento e libertação controlada dos ingredientes bioativos (Sapei, Naqvi e Rousseau, 2012). No entanto, a dupla emulsão A1/O/A2 por evaporação de solvente é um processo complexo e termodinamicamente instável (Iqbal *et al.*, 2015).

Estévez *et al.* (2019) investigaram como várias estruturas interfaciais constituídas por caseinato de sódio e dois polissacarídeos diferentes, carboximetilcelulose e goma arábica, afetam a estabilidade física e a libertação de compostos fenólicos de BAUV aprisionados numa emulsão A1/O/A2. Concluíram que, na globalidade, o uso de complexos eletrostáticos de proteína-polissacarídeo parece ser uma estratégia eficaz para ajustar as propriedades interfaciais ao produzir duplas emulsões A1/O/A1 com libertação dos compostos controlada por difusão.

Conhecidas as vantagens e as desvantagens das técnicas de *spray drying* e de dupla emulsão por evaporação de solvente, destaca-se o facto do *spray drying* não ser adequado para o revestimento de compostos termossensíveis e do agente encapsulante de interesse (EC) não

ser solúvel em água, o que faz com que a dupla emulsão por evaporação de solvente seja a técnica mais apropriada para a microencapsulação de extratos ricos em compostos fenólicos de BAUV. Estudos realizados por Paulo e Santos (2018a, 2020b) utilizaram a técnica de dupla emulsão por evaporação de solvente e a EC como agente encapsulante para microencapsular eugenol e tirosol. As micropartículas carregadas com eugenol e as micropartículas carregadas com tirosol apresentaram um tamanho médio de 11,4  $\mu\text{m}$  e 8,8  $\mu\text{m}$ , respectivamente, valores que se encontram na gama desejável do presente projeto e que suportam a escolha da técnica e do agente encapsulante. O estudo da microencapsulação do eugenol permitiu ainda concluir quanto à libertação controlada do composto ativo - este não fica protegido permanentemente, sendo libertado sob certas condições.

O esquema proposto do método para a microencapsulação de extratos ricos em compostos fenólicos de uva encontra-se apresentado na Figura 9, e uma descrição mais detalhada pode ser consultada no Anexo B - Método para a microencapsulação do extrato rico em compostos fenólicos.



**Figura 9** - Representação esquemática dos principais passos para a obtenção de micropartículas pela técnica de dupla emulsão água em óleo em água por evaporação de solvente.

### 2.4.3 Caracterização das micropartículas

Vários parâmetros, como as propriedades dos materiais do núcleo e da parede, parâmetros da formulação e condições operacionais, podem afetar as micropartículas e as suas características finais. As principais propriedades afetadas são a eficiência de encapsulação, o rendimento de produção, o tamanho médio das partículas, a distribuição do tamanho e a morfologia da superfície das partículas (Paulo e Santos, 2017). O controlo das propriedades finais das micropartículas assume um papel fundamental na estabilidade e viabilidade do material do núcleo e no perfil de libertação dos compostos bioativos (Ye, Georges e Selomulya, 2018).

A eficiência de encapsulação (EE) relaciona a quantidade de compostos bioativos presente nas micropartículas com a inicialmente adicionada para a microencapsulação, e pode ser obtida a partir da massa de compostos bioativos, conteúdo fenólico total ou atividade antioxidante total. Considerando a massa de compostos bioativos, a EE é obtida pela Eq. 1:

$$EE (\%) = \frac{m_{CB}}{m_I} = \frac{m_I - m_O}{m_I} \quad \text{Eq. 1}$$

onde  $m_{CB}$  corresponde à massa de compostos bioativos microencapsulados,  $m_I$  à massa de compostos bioativos inicialmente adicionada na microencapsulação, e  $m_O$  à massa de compostos bioativos que não foram microencapsulados.

Por sua vez, o rendimento de produção (RP), obtido pela Eq.2, relaciona a quantidade de micropartículas produzidas e a quantidade de agente encapsulante e compostos bioativos adicionados para a microencapsulação (Paulo e Santos, 2018b).

$$RP (\%) = \frac{m_M}{m_A} = \frac{m_M}{m_I + m_P} \quad \text{Eq. 2}$$

sendo  $m_M$  a massa de micropartículas secas e  $m_A$  a soma da massa de compostos bioativos inicialmente adicionada na microencapsulação ( $m_I$ ) e da massa de polímero usado na microencapsulação ( $m_P$ ).

O tamanho das partículas obtidas pela microencapsulação exerce uma influência significativa nas propriedades de libertação dos compostos bioativos, assim como na reologia, textura, propriedades sensoriais, qualidade e estabilidade do produto alimentar no qual são inseridas (Đorđević *et al.*, 2016). Embora a aplicação da nanotecnologia em vários campos da indústria alimentar tenha aumentado (Yu *et al.*, 2018), ainda não é claro se as nanopartículas incorporadas em produtos alimentares causam efeitos adversos no organismo humano ou no meio ambiente (Jafari, Katouzian e Akhavan, 2017; McClements e Xiao, 2017). Neste sentido, não se pretende a obtenção de nanopartículas no contexto do presente projeto, de forma a assegurar uma maior aceitação e segurança dos consumidores e da indústria alimentar ao produto fortificado. Por outro lado, partículas de grandes dimensões podem afetar significativamente a textura e as propriedades sensoriais do alimento fortificado, sendo que partículas com tamanho superior a 22  $\mu\text{m}$  podem ser detetadas no produto final. A incorporação de partículas de grandes dimensões pode ser desejável para algumas aplicações em especial, como nos produtos alimentares crocantes (Đorđević *et al.*, 2016); contudo, não é o pretendido para o caso de estudo deste projeto.

Tendo em conta a aplicação industrial no setor alimentar, é fundamental ter em consideração a homogeneidade do tamanho das micropartículas. Esta irá assim assegurar a consistência e a similaridade dos produtos fortificados, bem como a sua replicabilidade e a

capacidade para prever o comportamento das micropartículas em relação à sua incorporação no alimento em questão, e ainda o perfil de libertação (Aguiar *et al.*, 2017). Assim sendo, a agregação ou aglomeração das micropartículas é indesejável no produto final. A avaliação da distribuição de tamanho das micropartículas pode ser realizada por granulometria por difração laser, um dos métodos mais populares, caracterizado por ser rápido, não invasivo e fidedigno (Pan, Ge e Zhang, 2017). O método baseia-se no princípio de que, quanto menor o tamanho da partícula, maior o ângulo de difração de um feixe luminoso que atravessa um conjunto de partículas (Storti e Balsamo, 2010).

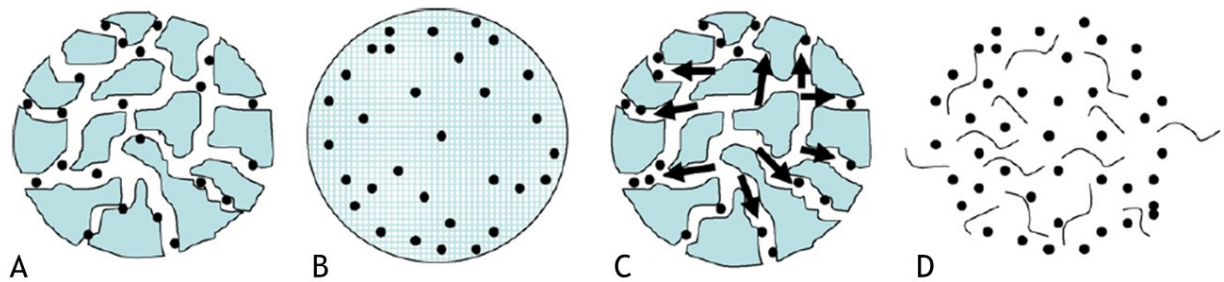
Quanto à morfologia externa, as micropartículas podem apresentar uma superfície externa de natureza regular ou irregular, formas diversas, com ou sem poros, fissuras ou rachaduras (Gonçalves *et al.*, 2017; Paulo e Santos, 2018b). Para a análise da morfologia pode recorrer-se ao microscópio eletrônico de varrimento (MEV), que utiliza um feixe de elétrons que interage com os átomos da amostra em análise, produzindo sinais que contêm informação sobre a topografia da superfície da amostra, composição e outras propriedades (Liu *et al.*, 2010). Para a aplicação da técnica, a amostra em análise deve ser condutora, sendo que, no caso de não o ser, o processo utilizado na preparação da amostra é a pulverização catódica, que permite o revestimento das amostras com materiais condutores, tais como o ouro (LED&MAT; Liu *et al.*, 2010). No Anexo C - Morfologia das micropartículas encontram-se imagens obtidas no MEV de micropartículas de etilcelulose carregadas com extrato rico em compostos fenólicos de BAUV, em experiências realizadas no laboratório do LEPABE.

A libertação controlada dos compostos bioativos é uma das principais vantagens da microencapsulação, uma vez que permite que os compostos fiquem disponíveis no meio e no tempo desejados, a uma taxa de libertação específica. Como consequência, o aumento da eficácia dos compostos fenólicos, permite reduzir a quantidade de aditivos necessária na indústria alimentar (Pothakamury e Barbosa-Cánovas, 1995).

Conforme apresentado na Figura 10, a libertação dos compostos bioativos das micropartículas pode dar-se através de 4 mecanismos diferentes: difusão através dos poros preenchidos com água, difusão através do polímero, osmose ou erosão do material encapsulante. Na realidade, a libertação dos compostos fenólicos pode ocorrer pela combinação de mais de um mecanismo de libertação, sendo que o mecanismo dominante pode mudar ao longo do tempo. Existem diversas propriedades que podem influenciar a real libertação dos compostos bioativos, podendo ser divididas em 5 categorias: (i) material encapsulante (características físico-químicas do polímero), (ii) material encapsulado (características físico-químicas dos compostos bioativos, quantidade de compostos bioativos microencapsulados e localização no interior das micropartículas), (iii) características das micropartículas (tamanho, porosidade, forma e densidade), (iv) condições *in vitro* (temperatura, agitação, composição do meio de libertação, pH e osmolaridade) e (v) condições

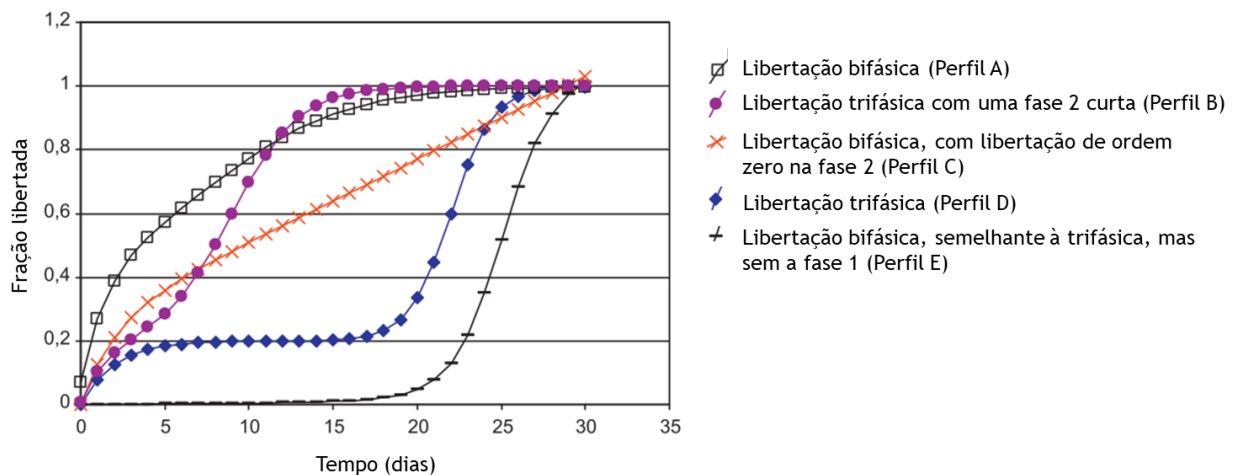


*in vivo* (presença de enzimas, lípidos e características físico-químicas da matriz) (Fredenberg *et al.*, 2011)



**Figura 10** - Mecanismos de liberação: (A) difusão através de poros preenchidos com água, (B) difusão através do polímero, (C) osmose e (D) erosão (retirada de (Fredenberg *et al.*, 2011)).

A taxa de liberação dos compostos bioativos pode apresentar variações ao longo do tempo. A Figura 11 apresenta alguns exemplos de perfis de liberação, para os quais se verifica a existência de diferentes fases de liberação.



**Figura 11** - Exemplos de perfis de liberação (adaptado de (Fredenberg *et al.*, 2011)).

Em geral, os perfis de liberação compreendem entre duas a três fases. A fase 1 é caracterizada por uma liberação rápida inicial de compostos bioativos e está relacionada essencialmente com os compostos que não são microencapsulados e que ficam adsorvidos na superfície das micropartículas. Esta fase está retratada em todos os perfis de liberação, à exceção do perfil E. Por sua vez, a fase 2 é geralmente associada a uma liberação mais lenta dos compostos. No caso do perfil C, a liberação dos compostos bioativos na fase 2 é de ordem zero, libertando-se a mesma quantidade de compostos bioativos por unidade de tempo, o que permite um maior controlo da taxa de liberação. A fase 3 pode ser caracterizada por mais uma liberação rápida, e que é frequentemente atribuída ao início da erosão (Fredenberg *et al.*, 2011).

Quando o objetivo da fortificação de produtos alimentares passa pela libertação controlada dos compostos bioativos durante o processamento, distribuição ou armazenamento dos alimentos, o estudo da libertação *in vitro* dos compostos bioativos é feito nos alimentos em questão ou em matrizes simuladas. No entanto, caso o objetivo seja a libertação dos compostos bioativos aquando da ingestão dos alimentos, o estudo da libertação *in vitro* é realizado pela simulação das condições gastrointestinais. A ação *European Cooperation in Science and Technology (COST) INFOGEST* desenvolveu um procedimento standard *in vitro* para a simulação da digestão humana, com base em 3 fluidos simulados diferentes - salivar, gástrico e intestinal - e na adição de enzimas características em cada meio - amílase salivar, pepsina, pancreatina e bile - respetivamente, em condições de pH e de temperatura específicas (Minekus *et al.*, 2014). A composição dos fluidos gastrointestinais simulados e outras considerações adicionais podem ser consultadas no Anexo D - Estudos de libertação *in vitro* em fluidos gastrointestinais simulados.

Em particular, no caso de estudo deste projeto, pretende-se a avaliação do perfil de libertação *in vitro* dos compostos bioativos, tanto nos queijos fortificados, como em condições gastrointestinais simuladas.

## 2.5 Determinação do teor fenólico total e da atividade antioxidante

A determinação do teor fenólico total e da atividade antioxidante, para além de fundamental para a caracterização dos extratos ricos em compostos fenólicos de BAUV e das micropartículas carregadas com os extratos referidos, é uma estratégia útil para avaliar os métodos de extração e de microencapsulação. Além disso, a quantificação dos compostos fenólicos e da atividade antioxidante é importante para a avaliação do perfil de libertação dos compostos bioativos, tanto nos alimentos fortificados, quanto na libertação gastrointestinal.

A determinação do teor fenólico total é geralmente realizada utilizando o método Folin-Ciocalteu (FC) (Sánchez-Rangel *et al.*, 2013), sendo amplamente relatado para a estimativa da quantidade total de compostos fenólicos presentes em extratos obtidos a partir de BAUV e em micropartículas carregadas com os extratos referidos. O princípio do método é baseado na transferência de eletrões entre o reagente de FC e os compostos fenólicos, resultando na formação de um complexo azul, quantificado por espectrofotometria de luz-visível (Blainski, Lopes e de Mello, 2013; Sánchez-Rangel *et al.*, 2013). Embora seja fácil de implementar e de ter uma resposta equivalente para diferentes compostos fenólicos do BAUV, o método FC apresenta várias desvantagens, por ser inespecífico, havendo a possibilidade de interferência de outros agentes redutores como o ácido ascórbico, a vitamina E, a vitamina C, açúcares redutores e até certos aminoácidos (Rover e Brown, 2013; Paulo e Santos, 2020a).

Inúmeros estudos *in vitro* foram desenvolvidos para avaliar a atividade antioxidante total, não existindo, até ao momento, um método *standard* oficial. Um dos métodos mais

utilizados é o ensaio de atividade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC), devido à sua simplicidade, enorme sensibilidade e ainda boa reprodutibilidade (Jung *et al.*, 2008; Fontana, Antonioli e Bottini, 2013). O ensaio TEAC, também conhecido como ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolína-6-sulfónico) (ABTS), mede a capacidade de os antioxidantes presentes na amostra reduzirem o catião radicalar  $ABTS^{\cdot+}$ , comparativamente à capacidade do antioxidante padrão de referência Trolox, quando testados sob condições idênticas. O radical  $ABTS^{\cdot+}$  é um cromóforo azul esverdeado com máxima absorção a 734 nm, que é descolorado quando reduzido na presença de antioxidantes. O mecanismo de reação é geralmente baseado na doação de elétrões; no entanto, o mecanismo baseado na doação de um átomo de hidrogénio também se aplica (Zhong e Shahidi, 2015).

## 2.6 Aplicação na indústria alimentar

A valorização de subprodutos da vinificação para a obtenção de produtos de elevado valor acrescentado, representa uma tendência de interesse crescente no setor alimentar. Os compostos fenólicos recuperados do BAUV podem ser incorporados em matrizes alimentares, desempenhando uma ampla gama de funções.

### **Melhoria das propriedades nutricionais dos alimentos e potenciais efeitos positivos na saúde**

Atualmente, os alimentos não se destinam apenas a saciar a fome e a fornecer os nutrientes necessários aos seres humanos, mas também a fornecer outros benefícios à saúde, tais como a redução do risco de certas doenças e o bem-estar físico e mental (Bigliardi e Galati, 2013). A crescente procura por estes alimentos funcionais pode ser justificada pelo aumento do custo dos cuidados de saúde e pelo desejo de melhor qualidade de vida e de longevidade (Betoret *et al.*, 2011). Neste contexto, o desenvolvimento de novos produtos alimentares funcionais tem sido cada vez mais desafiante para fazer face à expectativa do consumidor na procura por produtos simultaneamente saborosos e saudáveis, além de pretender corresponder à preferência por produtos 100% naturais (Betoret *et al.*, 2011; Román, Sánchez-Siles e Siegrist, 2017). Assim sendo, a incorporação de compostos fenólicos de BAUV pode contribuir para a melhoria das propriedades nutricionais dos alimentos e com potenciais efeitos positivos na saúde humana, nomeadamente na prevenção de doenças associadas ao stress oxidativo (García-Lomillo e González-SanJosé, 2017).

### **Proteção contra processos oxidativos**

A indústria alimentar tem utilizado antioxidantes sintéticos, como o butil-hidroxianisol (BHA) e o butil-hidroxitolueno (BHT), para mitigar a oxidação de diferentes componentes durante o armazenamento ou o processamento dos produtos alimentares, evitando a consequente redução da qualidade e das propriedades nutricionais dos alimentos (García-

Lomillo e González-SanJosé, 2017). Contudo, estes antioxidantes têm sido associados a diferentes efeitos toxicológicos (Ito, Fukushima e Tsuda, 1985; Williams, Wang e Iatropoulos, 1990) e, por essa razão, as políticas alimentares de vários países têm vindo a restringir cada vez mais o seu uso (García-Lomillo e González-SanJosé, 2017). Por este motivo, existe uma preocupação crescente do consumidor com os potenciais riscos de aditivos químicos, aumentando a procura por produtos 100% naturais (Carocho, Morales e Ferreira, 2015). Desta forma, os compostos fenólicos de BAUV surgem como uma excelente alternativa aos antioxidantes sintéticos.

As reações de oxidação lipídica constituem uma das principais causas de deterioração de produtos alimentares, visto que os lípidos são componentes alimentares muito suscetíveis de serem oxidados (Subramaniam, 2016). A oxidação lipídica inclui a alteração de sabor e desenvolvimento de odores desagradáveis, assim como a mudança de cor, perda de valor nutricional e a formação de compostos potencialmente tóxicos, o que torna os alimentos inadequados ao consumo humano, limitando, assim, o seu prazo de validade (Wasowicz *et al.*, 2004). Desta forma, a incorporação de antioxidantes recuperados do BAUV é uma forma eficaz de retardar a oxidação lipídica nos alimentos, permitindo preservar o alimento e aumentar o prazo de validade.

#### **Ação antimicrobiana contra microrganismos deteriorantes de alimentos ou patogénicos**

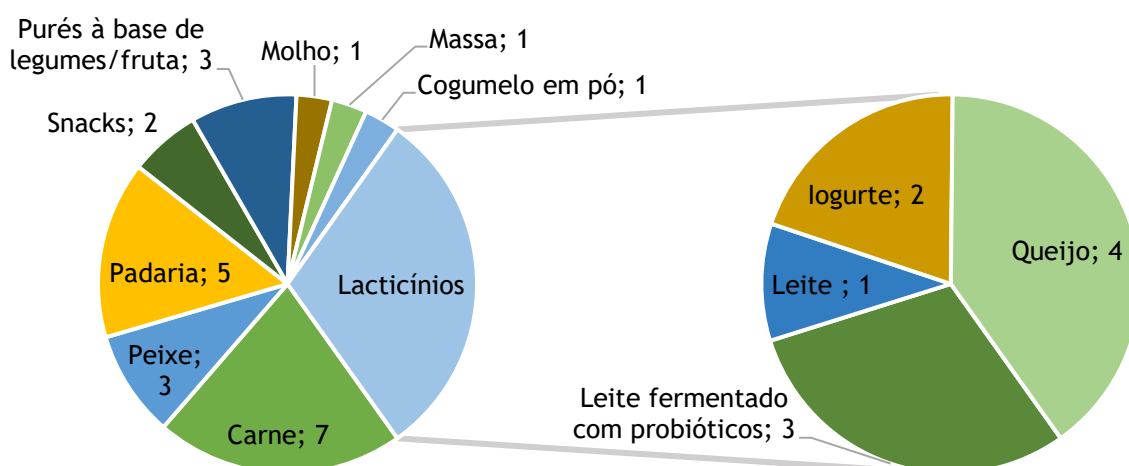
A deterioração de alimentos provocada por grupos específicos de microrganismos (bactérias, fungos ou leveduras) é a principal causa de desperdício de produtos alimentares, ao qual se associam perdas financeiras (Subramaniam, 2016). Os microrganismos altamente ativos podem alterar a qualidade de um produto alimentar por um ou mais dos seguintes fatores: odores desagradáveis, alterações no sabor, cor ou na textura do alimento, acidificação ou produção de gás (Fellows, 2009). Consequentemente, este fenómeno de deterioração reduz a aceitação do produto final pelo consumidor e limita o prazo de validade. Além disso, as doenças transmitidas pelos alimentos, causadas pelo consumo de produtos alimentares contaminados por microrganismos patogénicos, representam um problema generalizado de segurança alimentar e de saúde pública (Gonelimali *et al.*, 2018). Assim sendo, a indústria alimentar tem procurado novas estratégias para reduzir o crescimento de microrganismos deteriorantes de alimentos e de microrganismos patogénicos, também com o objetivo de prolongar o prazo de validade dos produtos alimentares. Com foco na utilização de compostos naturais com atividade antimicrobiana para a substituição de conservantes químicos, a incorporação de compostos fenólicos derivados do BAUV surge como uma alternativa eficaz (García-Lomillo e González-SanJosé, 2017).

## Alteração das propriedades sensoriais do alimento

Os compostos fenólicos derivados do BAUV também podem ser usados para modificar as propriedades sensoriais dos produtos alimentares, principalmente as características cromáticas, pelo uso de antocianinas como corante alimentar natural. Contudo, à exceção de quando o efeito de coloração é desejado, o uso de compostos fenólicos de BAUV pode induzir alterações nas cores dos alimentos, provocando efeitos incomuns, que podem limitar a sua aplicação (García-Lomillo e González-SanJosé, 2017). Para além das modificações causadas na aparência dos alimentos, os compostos fenólicos também podem provocar alterações no paladar, através do gosto amargo e adstringente. O aumento da adstringência pode ser positivo em alguns produtos alimentares, como no chocolate, chá, cidra ou vinho, mas, em geral, é considerado um atributo negativo pelo consumidor (Lesschaeve e Noble, 2005).

A pesquisa literária do presente tópico foi baseada no método *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses* (PRISMA), considerando duas abordagens: a incorporação de extratos ricos em compostos fenólicos de BAUV e a incorporação de micropartículas carregadas com os extratos referidos em matrizes alimentares. O procedimento do método PRISMA aplicado na presente revisão encontra-se descrito no Anexo E - Método *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses* (PRISMA).

De acordo com a compilação de estudos apresentados na Tabela 3, extratos ricos em compostos fenólicos de BAUV já foram adicionados a diferentes tipos de produtos alimentares, tais como carnes, peixes, produtos de panificação (como pão e biscoitos), e lacticínios, estando o número de publicações referente a cada categoria indicado Figura 12. Por sua vez, a incorporação de micropartículas carregadas com extrato rico em compostos fenólicos de BAUV em matrizes alimentares ainda não é um tema muito explorado, reforçando, assim, a relevância do presente projeto. Verifica-se na Tabela 4 a incorporação de micropartículas apenas em puré de maçã, biscoitos e iogurte.



**Figura 12** - Número de publicações incluídas na revisão sistemática de incorporação de extratos ricos em compostos fenólicos de bagaço de uva para cada categoria de alimentos, durante o período de 2000-2020.

Tabela 3 - Estudos da literatura relativos à incorporação de extratos ricos em compostos fenólicos de bagaço de uva em produtos alimentares (entre 2000 e 2020).

Tipo de produto	Produto alimentar	Objetivos	Resultados	Referência
Carne	Rissóis de carne de porco	Avaliar a atividade antioxidantes de extratos naturais quando incorporados numa matriz alimentar complexa	A eficiência do efeito antioxidante do extrato de bagaço foi superior aos extratos de café e chá, mas inferior ao do alecrim	(Nissen <i>et al.</i> , 2004)
		Avaliar o efeito da adição de extratos promotores de saúde na oxidação lipídica, nas propriedades físico-químicas, microbianas e organoléticas dos rissóis, durante o armazenamento	Atividade antioxidante pronunciada Não foi observado nenhum efeito antimicrobiano nem de variação de pH pela adição do extrato de BAUV Alteração da cor do produto, mas sem modificações ao nível sensorial	(Carpenter <i>et al.</i> , 2007)
	Carne moída	Investigar o efeito de extratos de plantas no crescimento microbiano, na alteração de cor e na oxidação lipídica da carne, comparando com antioxidantes sintéticos	O extrato de BAUV contribuiu significativamente para a atividade antimicrobiana e antioxidante	(Ahn, Gru e Mustapha, 2007)
	Salsicha de carne	Comparar a adição de extrato de BAUV com antioxidantes comumente usados, em salsicha pré-cozinhada e congelada	O extrato permitiu reter o sabor e o odor fresco da salsicha por mais tempo Alteração da cor das amostras durante o armazenamento	(Kulkarni <i>et al.</i> , 2011)
	Hambúrgueres de porco	Avaliar o efeito nas características físico-químicas do hambúrguer e a viabilidade do uso de extratos como conservantes naturais	A adição do extrato não afetou o valor de pH nem a deterioração microbiana Diminuição da oxidação lipídica e maior estabilidade da cor	(Garrido <i>et al.</i> , 2011)
	Frango (desidratado)	Determinar o efeito de extratos naturais na estabilidade oxidativa da carne	O extrato de BAUV foi o menos eficaz na prevenção da oxidação comparativamente ao extrato de café, chá e alecrim	(Nissen <i>et al.</i> , 2000)
	Carne de frango	Avaliar o efeito do extrato na oxidação lipídica, nas propriedades físico-químicas e sensoriais da carne de frango (crua e cozinhada) e congelada por 9 meses	O pH não foi afetado pela adição de extrato Alteração da cor do frango cozinhado, mas odor e sabor com resultados semelhantes aos antioxidantes sintéticos Eficácia na inibição da oxidação lipídica	(Selani <i>et al.</i> , 2011)
Peixe	Cavala	Estudar a atividade antioxidante do extrato de BAUV em sistemas alimentares	Os oligómeros de flavanois foram os inibidores mais eficazes na inibição da oxidação do músculo do peixe congelado	(Pazos <i>et al.</i> , 2005)
		Estudar o efeito da adição do extrato ao músculo da cavala quanto à estabilidade lipídica durante o armazenamento	A oxidação lipídica foi retardada durante o armazenamento O extrato mostrou-se um inibidor muito eficaz dos produtos de oxidação primária e secundária	(Ozen <i>et al.</i> , 2011)

Paderia	Bacalhau	Prevenir a oxidação dos lípidos da membrana durante o armazenamento em gelo	Inibiu completamente o odor rançoso durante o armazenamento	(Sánchez-Alonso <i>et al.</i> , 2007)
	Pão	Investigar a alteração da atividade antioxidante e o efeito na formação de CML	O processamento térmico diminuiu a atividade antioxidante do extrato, contudo houve um aumento da capacidade antioxidante total do pão Mudança favorável na cor do pão, sem causar alterações sensoriais significativas	(Peng <i>et al.</i> , 2010)
		Investigar o potencial uso de subprodutos de vinificação como efeito protetor na saúde cardiovascular	Podem contribuir para uma redução do risco cardiovascular Sem alterações na aceitabilidade do consumidor	(Mildner-Szkudlarz e Bajerska, 2013)
		Produção de um pão funcional, pela substituição de água por extrato aquoso de BAUV	Aumento do teor fenólico e da atividade antioxidante Propriedades físicas e sensoriais fortemente modificadas	(Baiano <i>et al.</i> , 2015)
	Biscoitos	Caracterizar o perfil físico-químico, sensorial e volátil dos biscoitos funcionais	Aumento do teor fenólico e da atividade antioxidante Diferenças significativas na cor e no perfil volátil, com alterações ao nível sensorial	(Pasqualone <i>et al.</i> , 2014)
		Entender as semelhanças/diferenças sensoriais e instrumentais entre biscoitos com extrato de bagaço e com micropartículas de extrato de bagaço Determinar o impacto na aceitação do consumidor	A adição de extrato de bagaço aumentou a atividade antioxidante Perfil de sabor com atributos semelhantes a biscoitos feitos com ingredientes de grãos integrais	(Davidov-Pardo <i>et al.</i> , 2012)
	Snacks	Batatas fritas	Reduzir a oxidação lipídica durante o armazenamento	Atividade antioxidante significativamente mais elevada e minimização da oxidação lipídica
Salgados de milho		Comparar a eficácia entre antioxidantes naturais e sintéticos durante o armazenamento	Ambos previnem a oxidação lipídica Diminuição do ranço e outros sabores indesejáveis	(Rababah <i>et al.</i> , 2011)
Molho para salada		Aumentar o valor nutricional e o tempo de armazenamento	Aumento do teor fenólico total e retardação da oxidação lipídica durante o armazenamento	(Tseng e Zhao, 2013)
	Massa	Aumentar a quantidade de compostos fenólicos e da atividade antioxidante, sem comprometer as características sensoriais	Aumento do teor fenólico e da atividade antioxidante Não há alteração das características sensoriais	(Marinelli <i>et al.</i> , 2015)

Produtos à base de legumes /fruta e purés	Sumo de laranja e maçã	Determinar o teor fenólico total, atividade antioxidante e atividade antifúngica <i>in vitro</i> e <i>in situ</i>	Atividade antioxidante significativa Efeito antifúngico considerável contra a levedura <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> , que é uma das causas mais frequentes de contaminação por fungos e de deterioração de alimentos	(Sagdic <i>et al.</i> , 2011)
	Puré infantil composto por carne de peru, batata, milho e arroz	Avaliar o efeito de uma matriz alimentar complexa na bioacessibilidade dos compostos fenólicos do extrato de bagaço e na atividade antioxidante durante a digestão <i>in vitro</i>	Aumento da recuperação total de compostos fenólicos após a digestão com a matriz alimentar Aumento da atividade antioxidante	(Pešić <i>et al.</i> , 2019)
	Puré (beterraba /ervilha/batata)	Analisar as consequências das interações entre os compostos fenólicos e o biopolímero nas propriedades químicas e sensoriais	As propriedades funcionais e sensoriais dos alimentos enriquecidos variam em função da sua composição e sabor original O puré de beterraba resultante foi o mais apropriado a neutralizar as sensações negativas induzidas pelos compostos fenólicos	(Bucalossi <i>et al.</i> , 2020)
Lacticínios	Cogumelo em pó	Desenvolver um ingrediente funcional, avaliando as suas propriedades bioativas e físicas	Maior conteúdo bioativo e melhores propriedades físicas	(Yılmaz e Bastioğlu, 2020)
	Leite fermentado com probióticos	Estudar os efeitos da adição de extrato fenólico aquoso ao meio de fermentação do leite desnatado	Os compostos fenólicos foram estáveis durante a fermentação e não interferiram no processo de fabricação	(Aliakbarian <i>et al.</i> , 2015)
		Avaliar o potencial do extrato de bagaço como ingrediente alimentar de lacticínios rico em antioxidantes	Melhorou o crescimento das bactérias do ácido láctico durante o processo de fermentação Redução significativa no tempo de fermentação	(de Azevedo <i>et al.</i> , 2018)
		Aumentar a quantidade de compostos bioativos, desenvolvendo, assim, um alimento com múltiplos benefícios à saúde	Aumento do teor fenólico Efeito protetor na viabilidade de <i>Lactobacillus acidophilus</i> Melhorou o sabor, a cor e a aceitação geral	(dos Santos <i>et al.</i> , 2017)
	Leite	Investigar o impacto do extrato fenólico nas propriedades sensoriais de bebidas à base de leite	Impacto na perceção dos atributos do leite, suprimindo sabores como a doçura	(Axten, Wohlers e Wegrzyn, 2008)
	Iogurte	Aumentar o valor nutricional e o tempo de armazenamento	Aumento do teor fenólico total e retardação da oxidação lipídica durante o armazenamento	(Tseng e Zhao, 2013)
Produzir iogurtes ricos em antioxidantes		Aumento do conteúdo fenólico e da atividade antioxidante Não afetou o pH nem a viabilidade de <i>Lactobacilli</i> Não causou grandes defeitos sensoriais	(Chouchouli <i>et al.</i> , 2013)	



Queijo	Avaliar as características texturais do produto	A coalhada de queijo contendo o extrato mostrou uma diminuição no teor de humidade, enquanto que a força do gel não foi afetada Diferenças estruturais no queijo (estrutura rugosa e granular)	(Han <i>et al.</i> , 2011a)
	Analisar a eficiência de retenção dos compostos fenólicos e as propriedades antioxidantes do produto	Diferentes níveis de retenção dos compostos na coalhada de queijo Atividade antioxidante eficaz Valor nutricional do queijo melhorado	(Han <i>et al.</i> , 2011b)
	Adicionar extrato comercial de BAUV ao leite e avaliar os efeitos nas propriedades de produção de queijo	Alteração das propriedades de produção de queijo A transferência dos compostos fenólicos para o queijo depende da concentração adicionada ao leite	(da Silva <i>et al.</i> , 2015)
	Aplicar o extrato rico em antioxidantes no queijo <i>Petit Suisse</i> e avaliar as propriedades tecnológicas, sensoriais e funcionais	Não houve diferença na aceitação sensorial do queijo fortificado, nem no conteúdo fenólico total Maior inibição da atividade de ECA	(Deolindo <i>et al.</i> , 2019)

**Nota:** CML - N<sup>ε</sup>-(carboximetil)lisina; ECA – enzima conversora de angiotensina

**Tabela 4** - Estudos da literatura relativos à incorporação de micropartículas carregadas com extratos ricos em compostos fenólicos de bagaço de uva em produtos alimentares (entre 2000 e 2020).

Produto alimentar fortificado	Objetivos	Resultados	Referência
Puré de maçã	Investigar a capacidade redutora do puré de maçã fortificado e a degradação de antocianinas e de compostos fenólicos não corantes, durante o tratamento térmico e o armazenamento	Elevados níveis antocianinas e flavonoides foram formulados no puré, com boa estabilidade de processamento e armazenamento Capacidade redutora duas vezes maior em relação ao puré de maçã de controlo	(Lavelli, Sri Harsha e Spigno, 2016)
Biscoitos	Entender as semelhanças/diferenças sensoriais e instrumentais entre biscoitos com extrato de bagaço e com micropartículas de extrato de bagaço Determinar o impacto na aceitação do consumidor	A microencapsulação mascarou parcialmente a cor que o extrato confere aos biscoitos e reduziu a degradação térmica do extrato O aroma e o sabor dos extratos não foram mascarados pelas micropartículas Atividade antioxidante significativamente mais elevada A preferência do consumidor não foi significativamente diferente relativamente aos biscoitos controlo	(Davidov-Pardo <i>et al.</i> , 2012)
	Avaliar a influência da adição das micropartículas nas propriedades funcionais e na aceitabilidade sensorial dos biscoitos	Aumento teor fenólico total e da capacidade antioxidante O encapsulamento protegeu os compostos bioativos durante o processamento térmico Alteração significativa da cor do produto, sem prejudicar a aceitabilidade do consumidor A estabilidade à oxidação não foi melhorada	(Dordoni <i>et al.</i> , 2019)
Iogurte	Avaliar a estabilidade das microcápsulas no iogurte e o seu efeito sobre as propriedades antioxidantes e físico-químicas durante a preparação e armazenamento do iogurte	As propriedades físico-químicas, o conteúdo fenólico total e o potencial antioxidante do iogurte fortificado permaneceram inalteradas durante o período de armazenamento	(Yadav <i>et al.</i> , 2018)

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 3 e na Tabela 4, a adição quer do extrato quer das micropartículas aos produtos alimentares permitiu, em geral, um aumento do teor fenólico total, assim como da atividade antioxidante.

Vários autores constataram que a incorporação de extratos ricos em compostos fenólicos de BAUV foi eficaz na diminuição/retardação da oxidação lipídica. Kulkarni *et al.* (2011) concluíram que a adição de extratos ricos em compostos fenólicos em salsicha permitiu preservar o sabor e o odor fresco do alimento por mais tempo, enquanto que Garrido *et al.* (2011) constataram que a diminuição da oxidação lipídica permitiu uma maior estabilidade da cor dos hambúrgueres de porco.

Um estudo realizado por Peng *et al.* (2010) verificou uma mudança favorável na cor do pão pela adição de extratos ricos em compostos fenólicos de BAUV, sem alterações sensoriais significativas. Já o estudo de Baiano *et al.* (2015) concluiu que as propriedades físicas e sensoriais do pão fortificado foram fortemente modificadas. Mildner-Szkudlarz e Bajerska (2013) constataram que a incorporação de extratos ricos em compostos fenólicos no pão não provocou alterações na aceitabilidade do consumidor.

Pasqualone *et al.* (2014) e dos Santos *et al.* (2016) verificaram diferenças significativas ao nível sensorial pela incorporação de extratos, em biscoitos e em leite fermentado com probióticos, respetivamente, sendo que no caso do leite verificou-se uma melhoria do sabor, da cor e da aceitação geral. Han *et al.* (2011a) verificaram diferenças estruturais no queijo ao incorporar extratos ricos em compostos fenólicos, e Han *et al.* (2011b) constataram melhorias no valor nutricional do queijo fortificado. Deolindo *et al.* (2019) concluíram que não houve diferença na aceitação do queijo fortificado com o extrato.

Além disso, verificou-se que o extrato rico em compostos fenólicos de bagaço tem efeito antifúngico considerável contra a levedura *Zygosaccharomyces rouxii* (Sagdic *et al.*, 2011) e que é capaz de melhorar o crescimento das bactérias do ácido láctico durante o processo de fermentação do leite (de Azevedo *et al.*, 2018).

Quanto aos estudos referentes à incorporação de micropartículas carregadas com extratos ricos em compostos fenólicos, Lavelli, Sri Harsha e Spigno (2016) observaram um aumento de duas vezes da capacidade redutora do puré de maçã fortificado, relativamente ao puré de maçã controlo. Davidov-Pardo *et al.* (2012) verificaram que a microencapsulação mascarou parcialmente a cor que o extrato confere aos biscoitos, contudo não foi capaz de mascarar o sabor e o aroma deste. Além disso, verificou-se neste estudo e no de Dordoni *et al.* (2019) que a microencapsulação protegeu os compostos bioativos durante o processamento térmico, permitindo reduzir a degradação térmica dos compostos. Pelo contrário, no estudo de Peng *et al.* (2010) baseado na incorporação de extrato rico em compostos fenólicos em pão, concluiu-se que o processamento térmico diminuiu a atividade antioxidante do extrato. De facto, como referido na secção 2.4, uma das principais vantagens da microencapsulação é

permitir a proteção dos compostos de interesse de condições adversas, como temperaturas elevadas, evitando a degradação dos compostos, mantendo-os funcionais.

## 2.7 Caso de estudo: fortificação de queijo

Num setor cada vez mais competitivo, a inovação é reconhecida por assumir um papel fundamental nas indústrias alimentares, a fim de se destacarem dos concorrentes e, simultaneamente, satisfazerem as expectativas dos consumidores. E neste contexto, a indústria de laticínios não é exceção, nem em particular o segmento da indústria de queijos (Almli *et al.*, 2011). A incorporação de extratos ricos em compostos fenólicos recuperados do BAUV ou de micropartículas carregadas com os extratos supramencionados, pode dar resposta a esta necessidade de inovação - para além de melhorar o valor nutricional dos queijos, também o preserva e contribui com inúmeros benefícios para a saúde humana.

Para o presente caso de estudo, foi estabelecido contacto com a empresa Lacticínios das Marinhas, através da Eng. Berta Castilho, para averiguar o interesse da empresa em colaborar neste projeto. A empresa apoiou desde logo o projeto (pode ser consultada a Carta de Apoio no Anexo F - Carta de Conforto/Apoio), reforçando a conveniência do estudo no queijo Marinhas.

O queijo Marinhas é um produto natural, fabricado com leite de vaca pasteurizado português, parcialmente desnatado. Contém fermentos láteos, cloreto de cálcio e coalho, mas é isento de corantes, conservantes ou outros aditivos. É também conhecido pelas suas características, como o baixo teor em matéria gorda (entre 12 e 14%), a textura macia e o facto de não possuir revestimento externo, o que lhe confere um contínuo processo de cura, que acentua o seu paladar (Lacticínios das Marinhas, 2019). Contudo, o facto de o queijo não possuir conservantes nem revestimento externo propicia a sua deterioração, por ação microbiana ou de processos oxidativos, e o aparecimento excessivo de bolors (como *Penicillium*, *Aspergillus* e *Cladosporium* (Kure e Skaar, 2019)) na sua superfície externa durante a fase de cura. Estes fatores limitam o prazo de validade do queijo Marinhas a 2 meses, aproximadamente. Neste sentido, o objetivo da incorporação de micropartículas carregadas com extratos ricos em compostos fenólicos de BAUV no queijo, consiste na libertação controlada dos compostos bioativos durante o armazenamento, para que estes desempenhem a sua atividade antioxidante e antimicrobiana ao longo do tempo, preservando assim o queijo e aumentando o prazo de validade do mesmo. Para além disso, outro dos objetivos da adição dos compostos fenólicos ao queijo consiste no melhoramento das suas propriedades nutricionais, com potenciais benefícios à saúde. Para um estudo comparativo, pretende-se também a adição dos extratos ricos em compostos fenólicos de BAUV ao queijo, para que se conclua, nomeadamente, quanto à maior ou menor estabilidade dos compostos fenólicos quando microencapsulados e quanto às características do queijo em ambas as situações.

Além das características naturais e saudáveis apresentadas pelo queijo Marinhos e das vantagens já referidas ao adicionar compostos fenólicos de BAUV, o enriquecimento nestes compostos bioativos terá um impacto positivo no consumidor no que concerne aos laticínios, face à oferta crescente de queijos com base vegetal que se está a insurgir cada vez mais no mercado.

### 2.7.1 Fabrico do queijo Marinhos

Para fortalecer o queijo Marinhos com extratos ricos em compostos fenólicos e micropartículas carregadas com o extrato mencionado, é essencial entender o seu processo de fabrico.

O fabrico do queijo Marinhos é um processo complexo que envolve várias etapas e modificações bioquímicas, tal como ilustrado no fluxograma de produção apresentado no Anexo G - Fluxograma da produção do queijo Marinhos. A pasteurização do leite, fornecido pela cooperativa LeicarCoop, é uma das principais etapas e é considerado o ponto crítico de controlo do processo. Este tratamento térmico é utilizado para eliminar os microrganismos patogénicos, permitindo minimizar os riscos para a saúde pública, melhorar a consistência do queijo e prolongar o seu prazo de validade (Fellows, 2009; Legg *et al.*, 2017). Considerada a etapa mais importante do fabrico do queijo, a coagulação permite a conversão do leite líquido num gel semissólido, designado por coalhada (Legg *et al.*, 2017). A coagulação do leite é provocada pela desestabilização das micelas de caseína por ação enzimática, com recurso à adição de um coagulante obtido pela fermentação controlada de *Rhizomucor miehei*, e pela acidificação provocada pelas bactérias *Lactococcus lactis ssp. lactis* e *Lactococcus lactis ssp. cremoris*, que produzem ácido láctico a partir da lactose. A acidificação permite ainda afetar a atividade do coagulante durante a produção, controlar ou impedir o crescimento de microrganismos deteriorantes de alimentos ou patogénicos, afetar o sabor e a qualidade do queijo e promover o dessoramento (saída do soro do queijo) e, por conseguinte, determinar a composição do queijo (especialmente o teor de humidade) (Bintsis e Papademas, 2018). Para além da acidificação provocada pelas bactérias, várias etapas promovem o dessoramento, tais como o corte, a moldagem, a prensagem e a salga, permitindo concentrar as caseínas e a gordura no queijo, determinando assim a composição do mesmo (Bintsis e Papademas, 2018).

Considerando o processo de produção do queijo Marinhos, a adição dos extratos ricos em compostos fenólicos ou das micropartículas deve ser feita de preferência na etapa de pasteurização do leite. Sendo a pasteurização o ponto crítico de controlo do processo, é crucial que nos passos que se seguem a esta etapa se evite a recontaminação da formulação por qualquer fonte. Desta forma, a incorporação no queijo, de extratos derivados do BAUV e de micropartículas, requer um tratamento térmico eficaz, pois a eventual presença de microrganismos patogénicos nestes ingredientes não pode ser descartada.

A quantidade de extrato de BAUV a adicionar ao queijo deve ter em consideração o comunicado enviado à FDA em 2003, que informa o estatuto GRAS dos extratos de sementes de uva e do seu acrescento a produtos láteos a níveis a variar entre 0,01 e 0,08%, sendo que para níveis superiores a 0,05% já se verifica sabor adstringente (FDA, 2003). Quanto à quantidade de micropartículas carregadas com o extrato a adicionar, deve-se ter também em consideração o comunicado referido para a quantidade de compostos ativos a microencapsular, e ainda os níveis de etilcelulose que podem ser adicionados em produtos láteos, referidos na secção 2.4.1.

### 2.7.2 Avaliação do queijo fortificado

Após o fabrico dos queijos fortificados, é crucial analisar se os objetivos definidos para a incorporação dos extratos e das micropartículas são cumpridos. Além disso, é importante avaliar as características dos queijos fortificados e comparar com o queijo Marinhas original, uma vez que não se pretende que a fortificação modifique as características autênticas e intrínsecas fundamentais do produto. Assim sendo, deve proceder-se à realização de análises físico-químicas, microbiológicas e sensoriais. Algumas das análises que se podem realizar aos queijos encontram-se apresentadas na Tabela 5. Para cada análise devem ser realizados 3 ensaios, considerando o queijo Marinhas com extratos ricos em compostos fenólicos de BAUV, o queijo Marinhas com micropartículas carregadas com os extratos referidos e o queijo Marinhas original (controlo). As análises devem ser realizadas semanalmente num período de 3 meses, para um estudo mais completo.

**Tabela 5** - Análises físico-químicas, microbiológicas e sensoriais a considerar na avaliação dos queijos fortificados.

Análises físico-químicas	Análises microbiológicas	Análises sensoriais
Medição do pH	Enumeração dos microrganismos totais a 30 °C	Testes de discriminação
Medição das características cromáticas	Enumeração de coliformes	Testes descritivos
Análise da textura	Enumeração de bolores e leveduras	Testes afetivos
Determinação do teor em gordura	Enumeração de <i>Escherichia coli</i>	
Determinação do teor de sólidos	Enumeração de <i>Staphylococcus coagulase positiva</i>	
Determinação do teor fenólico total	Enumeração de <i>Bacillus cereus</i>	
Determinação da atividade antioxidante	Enumeração de <i>Salmonella spp.</i>	
Avaliação do grau de oxidação lipídica	Enumeração de <i>Listeria monocytogenes</i>	

Além das análises físico-químicas normalmente realizadas na empresa, é de realçar a determinação do teor em compostos fenólicos e da atividade antioxidante, através dos métodos FC e ABTS, respetivamente, já descritos na secção 2.5. Estes ensaios permitem aferir se a incorporação dos extratos e/ou das micropartículas aumenta o teor fenólico total e a atividade antioxidante do queijo, comparativamente ao queijo Marinhas controlo. Além disso, dada a realização periódica dos métodos, é possível perceber ao longo do tempo se a microencapsulação oferece uma maior proteção aos compostos bioativos, mantendo-os funcionais durante mais tempo, em comparação à adição direta dos extratos no queijo.

Destaca-se também a avaliação do grau de oxidação lipídica, uma vez que permite concluir se a incorporação dos extratos e/ou das micropartículas retarda a oxidação lipídica nos queijos. Existem inúmeros procedimentos analíticos baseados em reações químicas para avaliar o grau de oxidação lipídica nos alimentos, podendo considerar-se a análise de produtos de oxidação primária ou secundária (Velasco, Dobarganes e Márquez-Ruiz, 2010). Devido à complexidade das análises, não existe um método específico descrito na literatura para avaliar o grau de oxidação nos queijos. No entanto, um dos indicadores mais comuns aplicado em laboratórios de controlo de qualidade consiste na determinação do valor de peróxido (VP), relativo à quantificação de hidroperóxidos (produtos de oxidação primária) (Wasowicz *et al.*, 2004; Velasco, Dobarganes e Márquez-Ruiz, 2010). A titulação iodométrica é o método mais comum para a determinação do VP. Esta baseia-se numa reação de oxidação-redução na qual o ião iodeto ( $I^-$ ), adicionado na forma de iodeto de potássio, reduz os hidroperóxidos, formando-se iodo ( $I_2$ ). Desta forma, a concentração de hidroperóxidos é diretamente proporcional à formação de  $I_2$  (Wasowicz *et al.*, 2004; Domínguez *et al.*, 2019).

Os hidroperóxidos são ainda decompostos em produtos de oxidação secundária, que consistem principalmente em aldeídos, de que é exemplo o malondialdeído (MDA) (Papastergiadis *et al.*, 2012). Em consequência, para a obtenção de informações confiáveis e completas do grau de oxidação lipídica nos queijos, a determinação do VP deve ser combinada com um método de análise de produtos de oxidação secundária (Domínguez *et al.*, 2019). O teste do ácido tiobarbitúrico (TBA) é o método mais comum para a quantificação do MDA, consistindo na medição espectral do complexo cor de rosa formado pela reação de TBA com MDA. Contudo, a reação não é específica para o MDA, e diferentes produtos de oxidação respondem ao teste. Consequentemente, o método é referido como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), a fim de abranger todas as substâncias que reagem com o TBA (Velasco, Dobarganes e Márquez-Ruiz, 2010; Papastergiadis *et al.*, 2012).

As análises microbiológicas são uma prática comum para garantir a qualidade e a segurança dos alimentos, permitindo inferir quanto à segurança para a saúde pública, à sua estabilidade ou prazo de validade dos produtos em condições normais de armazenamento, ao nível de higiene usado durante todo o processo de fabrico, bem como verifica se os alimentos atendem aos critérios microbiológicos definidos (Erkmen e Bozoglu, 2016). As análises

microbiológicas, no contexto do presente trabalho, devem focar-se na identificação e enumeração dos microrganismos deteriorantes de alimentos e dos microrganismos patogénicos (alguns destes listados na Tabela 5). Para tal, o método de contagem de unidades formadoras de colónias (UFC) em meio de cultura seletivo é um dos métodos quantitativos mais utilizados na indústria alimentar (Erkmen e Bozoglu, 2016). Com estas análises, pretende-se concluir quanto à ação antimicrobiana dos compostos fenólicos no queijo Marinhas durante o armazenamento, verificando-se se a incorporação dos extratos ricos em compostos fenólicos e/ou das micropartículas permite reduzir a deterioração e o crescimento de bactérias patogénicas nos queijos e, conseqüentemente, aumentar o prazo de validade. Mais uma vez, pretende-se verificar se a estratégia de microencapsulação dos extratos possibilita uma maior eficácia dos compostos bioativos ao longo do tempo.

As análises sensoriais permitem reduzir o risco nas decisões relativas ao desenvolvimento de produtos e permitem atender melhor às necessidades e expectativas dos consumidores, garantindo uma maior oportunidade de sucesso no mercado. São frequentemente utilizados três tipos de testes sensoriais, cada um com um objetivo diferente: testes de discriminação, testes descritivos e testes afetivos (Lawless e Heymann, 2010).

Os testes de discriminação permitem determinar se duas ou mais amostras são perceptivelmente diferentes, sendo mais úteis quando as diferenças entre as amostras não são óbvias (Lawless e Heymann, 2010). No contexto do presente projeto, seria realizado o teste triangular, no qual três amostras são apresentadas simultaneamente ao painel de provadores, sendo que duas delas são da mesma formulação do queijo Marinhas e uma é de formulação diferente; cada membro do painel deve indicar a amostra que considera diferente. Com este teste pretende-se comparar se o queijo Marinhas ao qual se adicionou extratos ricos em compostos fenólicos é perceptivelmente diferente do queijo Marinhas com micropartículas e, por sua vez, se estes apresentam diferenças sensoriais perceptíveis relativamente ao queijo Marinhas original.

Os testes descritivos são geralmente úteis quando se deseja uma especificação detalhada dos atributos sensoriais de um único produto ou uma comparação das diferenças sensoriais entre vários produtos. Uma análise descritiva genérica compreende entre 8 e 12 membros de painel, que devem ser treinados para garantir a consistência e a reprodutibilidade das análises. Frequentemente, usa-se uma escala quantitativa para a intensidade dos atributos, que permite que os dados sejam analisados estatisticamente. A análise descritiva de vários parâmetros, como a aparência, o cheiro, o sabor e a textura, pode indicar exatamente como, na dimensão sensorial, as 3 formulações de queijo Marinhas (original, com extratos ricos em compostos fenólicos e com micropartículas carregadas com os extratos supramencionados) são diferentes, já que permite identificar a natureza e a magnitude de uma diferença sensorial (Lawless e Heymann, 2010).



Os testes afetivos têm duas abordagens principais: a avaliação da preferência e a avaliação da aceitação dos produtos. Como se trata de avaliações sensoriais do consumidor, não são necessários provadores treinados; contudo, estas devem ser representativas da população para a qual os resultados serão generalizados (Lawless e Heymann, 2010). Para a avaliação da preferência dos produtos, seriam apresentados os 3 queijos Marinhas em estudo e o provador deveria indicar qual é o seu queijo preferido - por exemplo, através de um *ranking* de preferência. Já na avaliação da aceitação dos produtos, os membros do painel poderiam classificar o seu gosto pelos produtos, através da escala hedónica de 9 pontos.

As análises físico-químicas, microbiológicas e sensoriais permitem assim concluir se o queijo Marinhas fortificado constitui um produto lácteo com valor acrescentado e correspondente aos requisitos da empresa, além de permitirem inferir se a encapsulação dos compostos bioativos extraídos do BAUV representa uma estratégia vantajosa e promissora na indústria alimentar.



### 3 Conclusões

As uvas são uma das frutas convencionais mais valorizadas do mundo, com uma produção anual de quase 78 milhões de toneladas, das quais 57% têm como destino a produção de vinho. A indústria do vinho gera elevadas quantidades de bagaço de uva (BAUV), um produto subvalorizado devido à falta de usos alternativos com benefícios económicos, e que contribui para o impacto ambiental, social e económico. O interesse na valorização deste resíduo concentra-se, nomeadamente, no facto de constituir uma fonte potencial de compostos fenólicos, que podem ser recuperados e aplicados como compostos funcionais em várias indústrias.

Apesar da procura pela utilização de técnicas de extração mais sustentáveis e seguras, no contexto do presente projeto o método de extração sólido-líquido (ESL) seria o mais adequado para a extração dos compostos fenólicos do BAUV, devido à simplicidade do protocolo e aos custos reduzidos de equipamentos e instalações.

Os compostos fenólicos do BAUV apresentam limitações quando aplicados na indústria, pois têm tendência a serem degradados, devido à sua fácil oxidação e baixa estabilidade face a fatores ambientais, como a temperatura e a luz. No caso da indústria alimentar, os extratos ricos em compostos fenólicos de BAUV devem ser previamente microencapsulados antes da incorporação em matrizes alimentares. A estratégia de microencapsulação permite a proteção dos compostos de interesse, permitindo a sua estabilidade e biodisponibilidade, para além de controlar a taxa de libertação. Assim, a técnica de dupla emulsão água em óleo em água (A1/O/A2) por evaporação de solvente surge como uma técnica adequada quer para o revestimento de compostos termossensíveis como para a utilização da etilcelulose (EC) como agente encapsulante - selecionada por possuir propriedades úteis à aplicação alimentar.

A incorporação de micropartículas carregadas com extratos ricos em compostos fenólicos de BAUV em alimentos permite ao setor alimentar reinventar-se através da obtenção de produtos com elevado valor acrescentado. Para além de melhorar a qualidade nutricional dos alimentos e poder influenciar positivamente a saúde humana, os compostos fenólicos também podem exibir excelentes atividades antioxidantes e antimicrobianas, permitindo, por sua vez, preservar os alimentos, evitando a redução da qualidade e das propriedades nutricionais.

O caso de estudo do queijo da Marinhas surge do interesse da Lacticínios das Marinhas em preservar e enriquecer as características do queijo. Dada a inovação trazida para o setor dos queijos e por se tratar de compostos naturais, a incorporação das micropartículas carregadas com extratos ricos em compostos fenólicos de BAUV no queijo surge como uma inovação promissora. Para avaliar o cumprimento dos objetivos definidos para a fortificação, e ainda as características dos queijos produzidos e a aceitação do consumidor, é importante a realização de análises físico-químicas, microbiológicas e sensoriais.



## 4 Limitações e trabalho futuro

Face à pandemia de COVID-19 e ao clima de dúvida e alarme social que se instalou e inviabilizou o normal prosseguimento das atividades laboratoriais, a Universidade do Porto determinou, em março, a adaptação das atividades a trabalho remoto. Dadas as limitações ao desenvolvimento do presente projeto em laboratório, os objetivos inicialmente definidos não foram cumpridos, tendo sido necessária a redefinição dos mesmos para uma vertente teórica.

Para trabalho futuro, sugere-se a realização dos objetivos inicialmente propostos para a dissertação. Propõe-se, então, a extração sólido-líquido (ESL) dos compostos fenólicos do bagaço de uva (BAUV), para posterior microencapsulação, pela técnica de dupla emulsão água em óleo em água (A1/O/A2) por evaporação do solvente e com a etilcelulose (EC) como agente encapsulante. As micropartículas carregadas com o extrato rico em compostos fenólicos devem ser caracterizadas, tanto pela determinação da eficiência de encapsulação e do rendimento de produção, como pela avaliação do tamanho médio das partículas, da distribuição do tamanho, da morfologia da superfície e da libertação *in vitro* dos compostos bioativos no alimento (ou numa matriz simulada) e em condições gastrointestinais simuladas. Como finalidade e principal inovação do projeto, propõe-se a incorporação das micropartículas obtidas no queijo Marinhas, produzido pela empresa Lacticínios das Marinhas. Sugere-se a realização de um estudo comparativo entre os queijos nos quais se incorporou extratos ricos em compostos fenólicos de BAUV e micropartículas carregadas com os extratos referidos, através de análises físico-químicas, microbiológicas e sensoriais.

Para além das sugestões referidas, seria também interessante otimizar o método de ESL, através do estudo da influência de vários parâmetros no rendimento de extração. Entre os parâmetros possíveis de avaliação, destaca-se o pré-tratamento da amostra por remoção da fração lipídica, o rácio solvente/amostra e o tamanho das partículas de BAUV (mais especificamente, a estipulação de um tamanho máximo de partícula, através utilização de um crivo). Sugere-se, ainda, a análise do extrato obtido por cromatografia líquida de elevada *performance* (HPLC), usando como padrões os principais compostos fenólicos existentes no BAUV de acordo com a literatura (como o ácido cafeico, ácido gálico, cianidina, *trans*-resveratrol). Também seria importante o desenvolvimento e validação de um método que permita determinar a concentração mínima inibitória (MIC) das micropartículas carregadas com extratos ricos em compostos fenólicos.



## Referências

- Aguiar, J. *et al.* (2017) 'Design of microparticles containing natural antioxidants: Preparation, characterization and controlled release studies', *Powder Technology*. Elsevier B.V., 313, pp. 287-292.
- Aguiar, J., Estevinho, B. N. e Santos, L. (2016) 'Microencapsulation of natural antioxidants for food application - The specific case of coffee antioxidants - A review', *Trends in Food Science and Technology*, 58, pp. 21-39.
- Ahn, J., Gru, I. U. e Mustapha, A. (2007) 'Effects of plant extracts on microbial growth, color change, and lipid oxidation in cooked beef', *Food Microbiology*, 24, pp. 7-14.
- Ajila, C. M. *et al.* (2011) 'Extraction and Analysis of Polyphenols: Recent trends', *Critical Reviews in Biotechnology*, 31(3), pp. 227-249.
- Aliakbarian, B. *et al.* (2015) 'Production of a novel fermented milk fortified with natural antioxidants and its analysis by NIR spectroscopy', *LWT - Food Science and Technology*, 62(1), pp. 376-383.
- Almli, V. L. *et al.* (2011) 'Consumers' acceptance of innovations in traditional cheese. A comparative study in France and Norway', *Appetite*, 57, pp. 110-120.
- Axten, L. G., Wohlers, M. W. e Wegrzyn, T. (2008) 'Using Phytochemicals to Enhance Health Benefits of Milk: Impact of Polyphenols on Flavor Profile', *Journal of Food Science*, 73(6), pp. 122-126.
- de Azevedo, P. O. de S. *et al.* (2018) 'Production of fermented skim milk supplemented with different grape pomace extract: Effect on viability and acidification performance of probiotic cultures', *PharmaNutrition*, 6, pp. 64-68.
- Baiano, A. *et al.* (2015) 'Physical and Sensory Properties of Bread Enriched with Phenolic Aqueous Extracts from Vegetable Wastes', *Czech Journal of Food Sciences*, 33, pp. 247-253.
- Balasundram, N., Sundram, K. e Samman, S. (2006) 'Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses', *Food Chemistry*, 99, pp. 191-203.
- Barbosa, D. (2015) 'Suporte escrito de apoio à Unidade Curricular de Processos de Separação: Extração com solventes'.
- Baydar, N. G. *et al.* (2006) 'Determination of antibacterial effects and total phenolic contents of grape (*Vitis vinifera* L.) seed extracts', *International Journal of Food Science and Technology*, 41(7), pp. 799-804.
- Beres, C. *et al.* (2017) 'Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: A review', *Waste Management*, 68, pp. 581-594.
- Betoret, E. *et al.* (2011) 'Functional foods development: Trends and technologies', *Trends in Food Science & Technology*, 22, pp. 498-508.
- Bigliardi, B. e Galati, F. (2013) 'Innovation trends in the food industry: The case of functional foods', *Trends in Food Science & Technology*, 31(2), pp. 118-129.
- Bintsis, T. e Papademas, P. (2018) 'An Overview of the Cheesemaking Process', em Papademas, P. e Bintsis, T. (eds) *Global Cheesemaking Technology: Cheese Quality and Characteristics*. 1ª Ed. John Wiley and Sons, pp. 120-156.
- Blainski, A., Lopes, G. C. e de Mello, J. C. P. (2013) 'Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense* L.', *Molecules*, 18, pp. 6852-6864.
- Bonnet, M. *et al.* (2009) 'Release rate profiles of magnesium from multiple W/O/W emulsions', *Food Hydrocolloids*, 23, pp. 92-101.

- Bouarab-Chibane, L. *et al.* (2019) 'Antibacterial properties of polyphenols: Characterization and QSAR (Quantitative structure-activity relationship) models', *Frontiers in Microbiology*, 10, pp. 1-23.
- Bouknana, D. *et al.* (2019) 'A phytotoxic impact of phenolic compounds in olive oil mill wastewater on fenugreek "Trigonella foenum-graecum"', *Environmental Monitoring and Assessment*, 191(405), pp. 1-20.
- Boussetta, N. *et al.* (2011) 'Valorisation of grape pomace by the extraction of phenolic antioxidants: Application of high voltage electrical discharges', *Food Chemistry*, 128, pp. 364-370.
- Brenes, A. *et al.* (2016) 'Use of polyphenol-rich grape by-products in monogastric nutrition. A review', *Animal Feed Science and Technology*, 211, pp. 1-17.
- Bucalossi, G. *et al.* (2020) 'Functional and sensory properties of phenolic compounds from unripe grapes in vegetable food prototypes', *Food Chemistry*, 315, pp. 1-9.
- Caldeira, C. *et al.* (2019) 'Quantification of food waste per product group along the food supply chain in the European Union: a mass flow analysis', *Resources, Conservation & Recycling*, 149, pp. 479-488.
- de Campos, L. M. A. S. *et al.* (2008) 'Free radical scavenging of grape pomace extracts from Cabernet sauvignon (*Vitis vinifera*)', *Bioresource Technology*, 99(17), pp. 8413-8420.
- Carocho, M., Morales, P. e Ferreira, I. C. F. R. (2015) 'Trends in Food Science & Technology Natural food additives: Quo vadis?', *Trends in Food Science & Technology*, 45, pp. 284-295.
- Carpenter, R. *et al.* (2007) 'Evaluation of the antioxidant potential of grape seed and bearberry extracts in raw and cooked pork', *Meat Science*, 76, pp. 604-610.
- Carrera, C. *et al.* (2012) 'Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes', *Analytica Chimica Acta*, 732, pp. 100-104.
- Carvalho, I. T., Estevinho, B. N. e Santos, L. (2016) 'Application of microencapsulated essential oils in cosmetic and personal healthcare products - a review', *International Journal of Cosmetic Science*, 38, pp. 109-119.
- Catalgol, B. *et al.* (2012) 'Resveratrol: French paradox revisited - Review Article', *Frontiers in Pharmacology*, 3(141), pp. 1-18.
- Chouchouli, V. *et al.* (2013) 'Fortification of yoghurts with grape (*Vitis vinifera*) seed extracts', *LWT - Food Science and Technology*, 53(2), pp. 522-529.
- Comissão Europeia (2015) *Comunicação da Comissão ao Parlamento Europeu, ao Conselho, ao Comité económico e social Europeu e ao Comité das regiões: Fechar o ciclo - plano de ação da UE para a economia circular.*
- Cortés, S. e Fernández, E. (2011) 'Differentiation of Spanish Alcoholic Drinks, Orujo, Obtained from Red and White Grape Pomace Distillation: Volatile Composition', *International Journal of Food Properties*, 14, pp. 1349-1357.
- Davidov-Pardo, G. *et al.* (2012) 'Sensory and Consumer Perception of the Addition of Grape Seed Extracts in Cookies', *Journal of Food Science*, 77(12), pp. 430-438.
- Davidov-Pardo, G., Arozarena, I. e Marín-Arroyo, M. R. (2013) 'Optimization of a Wall Material Formulation to Microencapsulate a Grape Seed Extract Using a Mixture Design of Experiments', *Food and Bioprocess Technology*, 6, pp. 941-951.
- Deolindo, C. T. P. *et al.* (2019) 'Phenolic-rich *Petit Suisse* cheese manufactured with organic Bordeaux grape juice, skin, and seed extract: Technological, sensory, and functional properties', *LWT - Food Science and Technology*, 115, pp. 1-7.
- 'Diretiva 2009/32/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 23 de abril de 2009 relativa à aproximação das legislações dos Estados-Membros sobre os solventes de extracção utilizados no fabrico de géneros



- alimentícios e dos respectivos ingredientes' (2009) *Jornal Oficial da União Europeia*, pp. 3-11.
- Domínguez, R. *et al.* (2019) 'A Comprehensive Review on Lipid Oxidation in Meat and Meat Products', *Antioxidants*, 8(429), pp. 1-31.
- Đorđević, V. *et al.* (2016) 'Encapsulation Technologies for Food Industry', em Nedović, V. *et al.* (eds) *Emerging and Traditional Technologies for Safe, Healthy and Quality Food*. 1ª Ed. Springer International Publishing, pp. 329-382.
- Dordoni, R. *et al.* (2019) 'Enrichment of Whole Wheat Cocoa Biscuits with Encapsulated Grape Skin Extract', *International Journal of Food Science*, pp. 1-11.
- Drevelegka, I. e Goula, A. M. (2020) 'Recovery of grape pomace phenolic compounds through optimized extraction and adsorption processes', *Chemical Engineering & Processing: Process Intensification*, 149, pp. 1-11.
- Drosou, C. *et al.* (2015) 'A comparative study on different extraction techniques to recover red grape pomace polyphenols from vinification byproducts', *Industrial Crops and Products*, 75, pp. 141-149.
- Dwyer, K., Hosseinian, F. e Rod, M. (2014) 'The Market Potential of Grape Waste Alternatives', *Journal of Food Research*, 3(2), pp. 91-106.
- Erkmen, O. e Bozoglu, T. F. (eds) (2016) 'Conventional Techniques in Food Microbiology', in *Food Microbiology: Principles into Practice*. 1ª Ed. John Wiley and Sons, pp. 233-244.
- Estévez, M. *et al.* (2019) 'Encapsulation of grape seed phenolic-rich extract within W/O/W emulsions stabilized with complexed biopolymers: Evaluation of their stability and release', *Food Chemistry*, 272, pp. 478-487.
- Etxabide, A. *et al.* (2018) 'Extraction and incorporation of bioactives into protein formulations for food and biomedical applications', *International Journal of Biological Macromolecules*, 120, pp. 2094-2105.
- Fang, Z. e Bhandari, B. (2010) 'Encapsulation of polyphenols - a review', *Trends in Food Science & Technology*, 21(10), pp. 510-523.
- FAO (2011) *Global food losses and food waste - Extent, causes and prevention*.
- Farrag, A. *et al.* (2018) 'Microencapsulation of Grape Phenolic Compounds Using Whey Proteins as a Carrier Vehicle', *Journal of Biological Sciences*, 18(7), pp. 373-380.
- FDA (2003) *Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN 000124*. Disponível em: <https://wayback.archive-it.org/7993/20171031022646/https://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm153940.htm> (Acedido a: 31 maio 2020).
- FDA (2013) *GRAS Notices, GRN No. 470*. Disponível em: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices&id=470> (Acedido a: 8 maio 2020).
- Fellows, P. J. (2009) *Food Processing Technology: Principles and Practice*. 3ª Ed. Woodhead Publishing.
- Fontana, A. R., Antonioli, A. e Bottini, R. (2013) 'Grape Pomace as a Sustainable Source of Bioactive Compounds: Extraction, Characterization, and Biotechnological Applications of Phenolics', *Journal of Agricultural and Food Chemistry composition*, 61, pp. 8987-9003.
- Frankel, E. N. *et al.* (1993) 'Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine', *The Lancet*, 341, pp. 454-457.
- Fredenberg, S. *et al.* (2011) 'The mechanisms of drug release in poly (lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems – A review', *International Journal of Pharmaceutics*, 415, pp. 34-52.
- Freeman, B. M. (1979) 'Interaction of irrigation and pruning level on growth and yield of Shiraz Vines', *American Journal of Enology and Viticulture*, 30(3), pp. 218-223.

FUSIONS (2016) *Estimates of European food waste levels*.

Gambini, J. *et al.* (2015) 'Properties of Resveratrol: *In Vitro* and *In Vivo* Studies about Metabolism, Bioavailability, and Biological Effects in Animal Models and Humans', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, pp. 1-13.

García-Lomillo, J. e González-SanJosé, M. L. (2017) 'Applications of Wine Pomace in the Food Industry: Approaches and Functions', *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16, pp. 3-22.

Garrido, M. D. *et al.* (2011) 'Effect of two different red grape pomace extracts obtained under different extraction systems on meat quality of pork burgers', *LWT - Food Science and Technology*, 44(10), pp. 2238-2243.

Ghafoor, K., AL-Juhaimi, F. Y. e Choi, Y. H. (2012) 'Supercritical Fluid Extraction of Phenolic Compounds and Antioxidants from Grape (*Vitis labrusca* B.) Seeds', *Plant Foods for Human Nutrition*, 67(4), pp. 407-414.

Gonçalves, B. *et al.* (2017) 'Microencapsulation of a Natural Antioxidant from Coffee – Chlorogenic Acid (3-Caffeoylquinic Acid)', *Food and Bioprocess Technology*.

Gonelimali, F. D. *et al.* (2018) 'Antimicrobial Properties and Mechanism of Action of Some Plant Extracts Against Food Pathogens and Spoilage Microorganisms', *Frontiers in Microbiology*, 9, pp. 1-9.

González-Centeno, M. R. *et al.* (2015) 'Effect of power ultrasound application on aqueous extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity from grape pomace (*Vitis vinifera* L.): Experimental kinetics and modeling', *Ultrasonics Sonochemistry*, 22, pp. 506-514.

González-SanJosé, M. L., Barron, L. J. R. e Díez, C. (1990) 'Evolution of anthocyanins during maturation of tempranillo grape variety (*Vitis vinifera*) using polynomial regression models', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 51, pp. 337-343.

González-SanJosé, M. L., Santa-Maria, G. e Díez, C. (1990) 'Anthocyanins as parameters for differentiating wines by grape variety, wine-growing region, and wine-making methods', *Journal of Food Composition and Analysis*, 3, pp. 54-66.

Han, J. *et al.* (2011a) 'Effect of polyphenolic ingredients on physical characteristics of cheese', *Food Research International*, 44(1), pp. 494-497.

Han, J. *et al.* (2011b) 'Polyphenolic compounds as functional ingredients in cheese', *Food Chemistry*, 124(4), pp. 1589-1594.

Hosseini, H., Tajiani, Z. e Jafari, S. M. (2019) 'Improving the shelf-life of food products by nano/micro-encapsulated ingredients', em Galanakis, C. M. (ed.) *Food Quality and Shelf Life*. Academic Press, pp. 159-200.

Ignat, I., Volf, I. e Popa, V. I. (2011) 'A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables', *Food Chemistry*, 126(4), pp. 1821-1835.

Iqbal, M. *et al.* (2015) 'Double emulsion solvent evaporation techniques used for drug encapsulation', *International Journal of Pharmaceutics*, 496, pp. 173-190.

Ito, N., Fukushima, S. e Tsuda, H. (1985) 'Carcinogenicity and modification of the carcinogenic response by BHA, BHT and other antioxidants', *Critical Reviews in Toxicology*, 15(2), pp. 109-149.

Jafari, S. M., Katouzian, I. e Akhavan, S. (2017) 'Safety and regulatory issues of nanocapsules', em Jafari, S. M. (ed.) *Nanoencapsulation Technologies for the Food and Nutraceutical Industries*. 1ª Ed. Academic Press, pp. 545-590.

Jayaprakasha, G. K., Selvi, T. e Sakariah, K. K. (2003) 'Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts', *Food Research International*, 36, pp. 117-122.

Jung, H. A. *et al.* (2008) 'Inhibitory effects of *Nelumbo nucifera* leaves on rat lens aldose reductase,

- advanced glycation endproducts formation, and oxidative stress', *Food and Chemical Toxicology*, 46(12), pp. 3818-3826.
- Jurgilevich, A. *et al.* (2016) 'Transition towards Circular Economy in the Food System', *Sustainability*, 8(69), pp. 1-14.
- Kalli, E. *et al.* (2018) 'Novel application and industrial exploitation of winery by-products', *Bioresources and Bioprocessing*, 5(46).
- Kalušević, A. M. *et al.* (2017) 'Effects of different carrier materials on physicochemical properties of microencapsulated grape skin extract', *Journal of Food Science and Technology*, 54(11), pp. 3411-3420.
- Kennedy, J. A., Matthews, M. A. e Waterhouse, A. L. (2000) 'Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening', *Phytochemistry*, 55, pp. 77-85.
- Khoddami, A., Wilkes, M. A. e Roberts, T. H. (2013) 'Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds', *Molecules*, 18, pp. 2328-2375.
- Kliewe, W. M. (1997) 'Influence of temperature, solar radiation and nitrogen on coloration and composition of Emperor Grapes', *American Journal of Enology and Viticulture*, 28(2), pp. 96-103.
- Korhonen, J., Honkasalo, A. e Seppälä, J. (2018) 'Circular Economy: The Concept and its Limitations', *Ecological Economics*, 143, pp. 37-46.
- Kuck, L. S., Wesolowski, J. L. e Noreña, C. P. Z. (2017) 'Effect of temperature and relative humidity on stability following simulated gastro-intestinal digestion of microcapsules of Bordo grape skin phenolic extract produced with different carrier agents', *Food Chemistry*, 230, pp. 257-264.
- Kulkarni, S. *et al.* (2011) 'Effect of grape seed extract on oxidative, color and sensory stability of a pre-cooked, frozen, re-heated beef sausage model system', *Meat Science*, 88(1), pp. 139-144.
- Kure, C. F. e Skaar, I. (2019) 'The fungal problem in cheese industry', *Current Opinion in Food Science*, 29, pp. 14-19.
- Lacticínios das Marinhas (2019) *Queijo Marinhas*. Disponível em: <https://www.lmarinhas.pt/pt/produtos/queijo-marinhas> (Acedido a: 28 maio 2020).
- Lavelli, V., Sri Harsha, P. S. C. e Spigno, G. (2016) 'Modelling the stability of maltodextrin-encapsulated grape skin phenolics used as a new ingredient in apple puree', *Food Chemistry*, 209, pp. 323-331.
- Lawless, H. T. e Heymann, H. (2010) *Sensory Evaluation of Food: Principles and Practices*. 2ª Ed. Springer.
- LED&MAT *Microscopia electrónica de varrimento com sistema EDS e WDS (análise química por raios X)*. Disponível em: <https://www.ipn.pt/laboratorio/LEDMAT/ensaio/15> (Acedido a: 16 maio 2020).
- Legg, A. K. *et al.* (2017) 'General Aspects of Cheese Technology', em McSweeney, P. L. H. *et al.* (eds) *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. 4ª Ed. Academic Press, pp. 643-675.
- Lesschaeve, I. e Noble, A. C. (2005) 'Polyphenols: factors influencing their sensory properties and their effects on food and beverage preferences', *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81, pp. 330-335.
- Li, J. *et al.* (2014) 'The use of W/O/W controlled-release coagulants to improve the quality of bitter-n-solidified tofu', *Food Hydrocolloids*, 35, pp. 627-635.
- Lin, D. *et al.* (2016) 'An Overview of Plant Phenolic Compounds and Their Importance in Human Nutrition and Management of Type 2 Diabetes - Review', *Molecules*, 21, pp. 1-19.
- Liu, F. *et al.* (2010) 'Morphology Study by Using Scanning Electron Microscopy', *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education*, pp. 1781-1792.
- Ma, W. *et al.* (2014) 'A review on astringency and bitterness perception of tannins in wine', *Trends in*

*Food Science & Technology*, 40, pp. 6-19.

Marinelli, V. *et al.* (2015) 'New Approach to Enrich Pasta with Polyphenols from Grape Marc', *Journal of Chemistry*, pp. 1-8.

McClements, D. J. e Xiao, H. (2017) 'Is nano safe in foods? Establishing the factors impacting the gastrointestinal fate and toxicity of organic and inorganic food-grade nanoparticles', *Journal npj Science of Food*, pp. 1-13.

Mildner-Szkudlarz, S. e Bajerska, J. (2013) 'Protective effect of grape by-product-fortified breads against cholesterol/cholic acid diet-induced hypercholesterolaemia in rats', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, pp. 3271-3278.

Minekus, M. *et al.* (2014) 'A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food - an international consensus', *Food & Function*, 5, pp. 1113-1124.

Mirabella, N., Castellani, V. and Sala, S. (2014) 'Current options for the valorization of food manufacturing waste: a review', *Journal of Cleaner Production*, 65, pp. 28-41.

Mohamed, H. Ben *et al.* (2016) 'Bioactive compounds and antioxidant activities of different grape (*Vitis vinifera* L.) seed oils extracted by supercritical CO<sub>2</sub> and organic solvent', *LWT - Food Science and Technology*, 74, pp. 557-562.

Moher, D. *et al.* (2009) 'Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement', *PLoS Medicine*, 6(7), pp. 1-6.

Moreno, T. *et al.* (2016) 'Spray Drying Formulation of Polyphenols-Rich Grape Marc Extract : Evaluation of Operating Conditions and Different Natural Carriers', *Food and Bioprocess Technology*, 9, pp. 2046-2058.

Moreno, T., Cocero, M. J. e Rodríguez-Rojo, S. (2018) 'Storage stability and simulated gastrointestinal release of spray dried grape marc phenolics', *Food and Bioprocess Technology*, 112, pp. 96-107.

Muñoz, P. *et al.* (2014) 'Using of waste pomace from winery industry to improve thermal insulation of fired clay bricks. Eco-friendly way of building construction', *Construction and Building Materials*, 71, pp. 181-187.

Murtaza, G. (2012) 'Ethylcellulose microparticles: A review', *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 69(1), pp. 11-22.

Nissen, L. R. *et al.* (2000) 'Protection of Dehydrated Chicken Meat by Natural Antioxidants as Evaluated by Electron Spin Resonance Spectrometry', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, pp. 5548-5556.

Nissen, L. R. *et al.* (2004) 'The antioxidative activity of plant extracts in cooked pork patties as evaluated by descriptive sensory profiling and chemical analysis', *Meat Science*, 68, pp. 485-495.

OIV (2019) *2019 Statistical Report on World Vitiviniculture*.

Otero-Pareja, M. J. *et al.* (2015) 'Green extraction of antioxidants from different varieties of red grape pomace', *Molecules*, 20(6), pp. 9686-9702.

Ozen, B. O. *et al.* (2011) 'Effect of plant extracts on lipid oxidation during frozen storage of minced fish muscle', *International Journal of Food Science and Technology*, 46, pp. 724-731.

Ozkan, G. *et al.* (2019) 'A review of microencapsulation methods for food antioxidants: Principles, advantages, drawbacks and applications', *Food Chemistry*, 272, pp. 494-506.

Pan, L., Ge, B. e Zhang, F. (2017) 'Indetermination of particle sizing by laser diffraction in the anomalous size ranges', *Journal of Quantitative Spectroscopy & Radiative Transfer*, 199, pp. 20-25.

Papastergiadis, A. *et al.* (2012) 'Malondialdehyde Measurement in Oxidized Foods: Evaluation of the

- Spectrophotometric Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) Test in Various Foods', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, pp. 9589-9594.
- Pasqualone, A. *et al.* (2014) 'Physico-chemical, sensory and volatile profiles of biscuits enriched with grape marc extract', *Food Research International*, 65, pp. 385-393.
- Paulo, F. e Santos, L. (2017) 'Design of experiments for microencapsulation applications: A review', *Materials Science and Engineering C*, 77, pp. 1327-1340.
- Paulo, F. e Santos, L. (2018a) 'Double emulsion solvent evaporation approach as a novel eugenol delivery system - Optimization by response surface methodology', *Industrial Crops and Products*, 126, pp. 287-301.
- Paulo, F. e Santos, L. (2018b) 'Inclusion of hydroxytyrosol in ethyl cellulose microparticles: *In vitro* release studies under digestion conditions', *Food Hydrocolloids*, 84, pp. 104-116.
- Paulo, F. e Santos, L. (2020a) 'Deriving valorization of phenolic compounds from olive oil by-products for food applications through microencapsulation approaches: a comprehensive review', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, pp. 1-26.
- Paulo, F. e Santos, L. (2020b) 'Encapsulation of the Antioxidant Tyrosol and Characterization of Loaded Microparticles: an Integrative Approach on the Study of the Polymer-Carriers and Loading Contents', *Food and Bioprocess Technology*, 13, pp. 764-785.
- Pazos, M. *et al.* (2005) 'Activity of grape polyphenols as inhibitors of the oxidation of fish lipids and frozen fish muscle', *Food Chemistry*, 92, pp. 547-557.
- Peng, X. *et al.* (2010) 'The effects of grape seed extract fortification on the antioxidant activity and quality attributes of bread', *Food Chemistry*, 119(1), pp. 49-53.
- Pereira, D. T. V. *et al.* (2019) 'Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from grape marc', *Journal of Food Engineering*, 240, pp. 105-113.
- Pešić, M. B. *et al.* (2019) '*In vitro* digestion of meat- and cereal-based food matrix enriched with grape extracts: How are polyphenol composition, bioaccessibility and antioxidant activity affected?', *Food Chemistry*, 284, pp. 28-44.
- Pinelo, M., Rubilar, M., *et al.* (2005) 'Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), pp. 2111-2117.
- Pinelo, M., Del Fabbro, P., *et al.* (2005) 'Optimization of continuous phenol extraction from *Vitis vinifera* byproducts', *Food Chemistry*, 92(1), pp. 109-117.
- Pinelo, M. *et al.* (2007) 'Supercritical fluid and solid - liquid extraction of phenolic antioxidants from grape pomace: a comparative study', *European Food Research and Technology*, 226, pp. 199-205.
- Pothakamury, U. R. e Barbosa-Cánovas, G. V. (1995) 'Fundamental aspects of controlled release in foods', *Trends in Food Science & Technology*, 6, pp. 397-406.
- Rababah, T. M. *et al.* (2011) 'Effect of Grape Seed Extracts on the Physicochemical and Sensory Properties of Corn Chips during Storage', *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88, pp. 631-637.
- Rababah, T. M. *et al.* (2012) 'Fortification of Potato Chips with Natural Plant Extracts to Enhance their Sensory Properties and Storage Stability', *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 89, pp. 1419-1425.
- Ratnasooriya, C. C. e Rupasinghe, H. P. V. (2012) 'Extraction of phenolic compounds from grapes and their pomace using  $\beta$ -cyclodextrin', *Food Chemistry*, 134, pp. 625-631.
- Renaud, S. e De Lorgeril, M. (1992) 'Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart

- disease', *The Lancet*, 339, pp. 1523-1526.
- Richter, B. E. *et al.* (1996) 'Accelerated solvent extraction: A technique for sample preparation', *Analytical Chemistry*, 68(6), pp. 1033-1039.
- da Rocha, C. B. e Noreña, C. P. Z. (2020) 'Microencapsulation and controlled release of bioactive compounds from grape pomace', *Drying Technology*, pp. 1-15.
- Rockenbach, I. I. *et al.* (2012) 'Characterization of flavan-3-ols in seeds of grape pomace by CE, HPLC-DAD-MSn and LC-ESI-FTICR-MS', *Food Research International*, 48, pp. 848-855.
- Román, S., Sánchez-Siles, L. M. e Siegrist, M. (2017) 'The importance of food naturalness for consumers: Results of a systematic review', *Trends in Food Science & Technology*, 67, pp. 44-57.
- Rostagno, M. A. e Prado, J. M. (2013) *Natural Product Extraction: Principles and Applications*. Royal Society of Chemistry.
- Routray, W. e Orsat, V. (2012) 'Microwave-Assisted Extraction of Flavonoids: A Review', *Food and Bioprocess Technology*, 5, pp. 409-424.
- Rover, M. R. e Brown, R. C. (2013) 'Quantification of total phenols in bio-oil using the Folin-Ciocalteu method', *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 104, pp. 366-371.
- Ruggieri, L. *et al.* (2009) 'Recovery of organic wastes in the Spanish wine industry. Technical, economic and environmental analyses of the composting process', *Journal of Cleaner Production*, 17, pp. 830-838.
- Sagdic, O. *et al.* (2011) 'RP-HPLC - DAD analysis of phenolic compounds in pomace extracts from five grape cultivars: Evaluation of their antioxidant, antiradical and antifungal activities in orange and apple juices', *Food Chemistry*, 126(4), pp. 1749-1758.
- Sánchez-Alonso, I. *et al.* (2007) 'Inhibition of Hemoglobin-Mediated Oxidation of Regular and Lipid-Fortified Washed Cod Mince by a White Grape Dietary Fiber', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, pp. 5299-5305.
- Sánchez-Rangel, J. C. *et al.* (2013) 'The Folin-Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination', *Analytical Methods*, 5, pp. 5990-5999.
- Santana-Méridas, O., González-Coloma, A. e Sánchez-Vioque, R. (2012) 'Agricultural residues as a source of bioactive natural products', *Phytochemistry Reviews*, 11, pp. 447-466.
- dos Santos, K. M. *et al.* (2017) 'Addition of grape pomace extract to probiotic fermented goat milk: the effect on phenolic content, probiotic viability and sensory acceptability', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97, pp. 1108-1115.
- Sapei, L., Naqvi, M. A. e Rousseau, D. (2012) 'Stability and release properties of double emulsions for food applications', *Food Hydrocolloids*, 27(2), pp. 316-323.
- Sarker, S. D. e Nahar, L. (2012) 'Accelerated Solvent Extraction for Natural Products Isolation', em Sarker, S. D. e Nahar, L. (eds) *Natural Products Isolation*. 3ª ed. Humana Press, pp. 75-87.
- Selani, M. M. *et al.* (2011) 'Wine industry residues extracts as natural antioxidants in raw and cooked chicken meat during frozen storage', *Meat Science*, 88(3), pp. 397-403.
- da Silva, D. F. *et al.* (2015) 'Effect of commercial grape extracts on the cheese-making properties of milk', *Journal of Dairy Science*, 98(3), pp. 1552-1562.
- da Silva, R. P. F. F., Rocha-Santos, T. A. P. e Duarte, A. C. (2016) 'Supercritical fluid extraction of bioactive compounds', *Trends in Analytical Chemistry*. Elsevier B.V., 76, pp. 40-51.
- Silva, S. *et al.* (2017) 'Anthocyanin extraction from plant tissues: A review', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(14), pp. 3072-3083.

- Soares, S., Mateus, N. e de Freitas, V. (2012) 'Effect of Condensed Tannins Addition on the Astringency of Red Wines', *Chemical Senses*, 37, pp. 191-198.
- Sobel, R., Versic, R. e Gaonkar, A. G. (2014) 'Introduction to Microencapsulation and Controlled Delivery in Foods', em Gaonkar, A. G. *et al.* (eds) *Microencapsulation in the Food Industry*. 1ª Ed. Academic Press, pp. 3-12.
- Spigno, G. e De Faveri, D. M. (2007) 'Antioxidants from grape stalks and marc: Influence of extraction procedure on yield, purity and antioxidant power of the extracts', *Journal of Food Engineering*, 78(3), pp. 793-801.
- Spigno, G., Tramelli, L. e De Faveri, D. M. (2007) 'Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics', *Journal of Food Engineering*, 81, pp. 200-208.
- Stănciuc, N. *et al.* (2017) 'Microencapsulation of Anthocyanins from Grape Skins by Whey Protein Isolates and Different Polymers', *Food and Bioprocess Technology*, 10, pp. 1715-1726.
- Stoll, L. *et al.* (2016) 'Microencapsulation of Anthocyanins with Different Wall Materials and Its Application in Active Biodegradable Films', *Food and Bioprocess Technology*, 9, pp. 172-181.
- Storti, F. e Balsamo, F. (2010) 'Particle size distributions by laser diffraction: sensitivity of granular matter strength to analytical operating procedures', *Solid Earth*, 1, pp. 25-48.
- Subramaniam, P. (2016) *The Stability and Shelf Life of Food*. 2ª Ed. Woodhead Publishing.
- Sun, B. *et al.* (2006) 'Stilbenes: Quantitative extraction from grape skins, contribution of grape solids to wine and variation during wine maturation', *Analytica Chimica Acta*, 563, pp. 382-390.
- Tao, Y., Zhang, Z. e Sun, D. (2014) 'Kinetic modeling of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from grape marc: Influence of acoustic energy density and temperature', *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(4), pp. 1461-1469.
- Teissedre, P. L. *et al.* (1996) 'Inhibition of *In Vitro* Human LDL Oxidation by Phenolic Antioxidants from Grapes and Wines', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 70, pp. 55-61.
- Tolun, A., Altintas, Z. e Artik, N. (2016) 'Microencapsulation of grape polyphenols using maltodextrin and gum arabic as two alternative coating materials: Development and characterization', *Journal of Biotechnology*, 239, pp. 23-33.
- Tournour, H. H. *et al.* (2015) 'Valorization of grape pomace: Extraction of bioactive phenolics with antioxidant properties', *Industrial Crops and Products*, 74, pp. 397-406.
- Treichel, H. *et al.* (2020) 'Circular Economy Based on Residue Valorization', in *Utilising Biomass in Biotechnology*. Ed. 1. Springer International Publishing, pp. 1-5.
- Tsali, A. e Goula, A. M. (2018) 'Valorization of grape pomace: Encapsulation and storage stability of its phenolic extract', *Powder Technology*, 340, pp. 194-207.
- Tseng, A. e Zhao, Y. (2013) 'Wine grape pomace as antioxidant dietary fibre for enhancing nutritional value and improving storability of yogurt and salad dressing', *Food Chemistry*, 138(1), pp. 356-365.
- Velasco, J., Dobarganes, C. e Márquez-Ruiz, G. (2010) 'Oxidative rancidity in foods and food quality', em Skibsted, L. H., Risbo, J., e Andersen, M. L. (eds) *Chemical deterioration and Physical instability of Food and Beverages*. Woodhead Publishing, pp. 3-32.
- Wasowicz, E. *et al.* (2004) 'Oxidation of lipids in food', *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 13(1), pp. 87-100.
- Wijngaard, H. *et al.* (2012) 'Techniques to extract bioactive compounds from food by-products of plant origin', *Food Research International*, 46(2), pp. 505-513.

- Williams, G. M., Wang, C. X. e Iatropoulos, M. J. (1990) 'Toxicity studies of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. II. Chronic feeding studies', *Food and Chemical Toxicology*, 28(12), pp. 799-806.
- Yadav, K. *et al.* (2018) 'Evaluation of total phenol content and antioxidant properties of encapsulated grape seed extract in yoghurt', *International Journal of Dairy Technology*, 71(1), pp. 96-104.
- Ye, Q., Georges, N. e Selomulya, C. (2018) 'Microencapsulation of active ingredients in functional foods: From research stage to commercial food products', *Trends in Food Science & Technology*, 78, pp. 167-179.
- Yi, C. *et al.* (2009) 'Fatty acid composition and phenolic antioxidants of winemaking pomace powder', *Food Chemistry*, 114, pp. 570-576.
- Yilmaz, Y. e Toledo, R. T. (2006) 'Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols', *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, pp. 41-48.
- Yilmaz, F. M. e Bastioğlu, A. Z. (2020) 'Production of phenolic enriched mushroom powder as affected by impregnation method and air drying temperature', *LWT - Food Science and Technology*, 122, pp. 1-8.
- Yu, H. *et al.* (2018) 'An Overview of Nanotechnology in Food Science: Preparative Methods, Practical Applications, and Safety', *Journal of Chemistry*, pp. 1-10.
- Yu, J. e Ahmedna, M. (2013) 'Functional components of grape pomace: their composition, biological properties and potential applications', *International Journal of Food Science and Technology*, 48, pp. 221-237.
- Zhang, Q.-W., Lin, L.-G. e Ye, W.-C. (2018) 'Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review', *Chinese Medicine*, 13(20), pp. 1-26.
- Zhong, Y. e Shahidi, F. (2015) 'Methods for the assessment of antioxidant activity in foods', em Shahidi, Fereidoon (ed.) *Handbook of Antioxidants for Food Preservation*. Woodhead Publishing, pp. 287-333.
- Zhu, F. *et al.* (2015) 'Advance on the bioactivity and potential applications of dietary fibre from grape pomace', *Food Chemistry*, 186, pp. 207-212.



# Anexos



## Anexo A - Método para a extração dos compostos fenólicos do bagaço de uva

Para a extração dos compostos fenólicos do bagaço de uva (BAUV) utiliza-se o método de extração sólido-líquido (ESL), como descrito por Spigno, Tramelli e De Faveri (2007).

A amostra de BAUV deve ser seca por liofilização (a  $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$  e à pressão de 10 mTorr durante 5 dias), e em seguida moída com recurso a uma varinha mágica. A extração dos compostos fenólicos realiza-se usando como solvente etanol 70%, num rácio solvente/amostra de 4:1 (V/m) (20 mL de etanol 70%:5 g de amostra seca). Coloca-se em refluxo com agitação magnética, num banho de água a  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 5 h, um balão de fundo redondo contendo o solvente de extração e a amostra (como representado na Figura A 1). Seguidamente, transfere-se a mistura para um tubo de falcon de 50 mL e efetua-se a centrifugação (20 min, 4000 rpm), sendo, posteriormente, descartado o *pellet*. Em seguida procede-se à filtração a vácuo do sobrenadante e, por fim, à evaporação do etanol no evaporador rotativo ( $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 58 mbar) e à remoção da água no liofilizador (a  $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$  e à pressão de 10 mTorr durante 5 dias). A experiência deve ser realizada em duplicado.

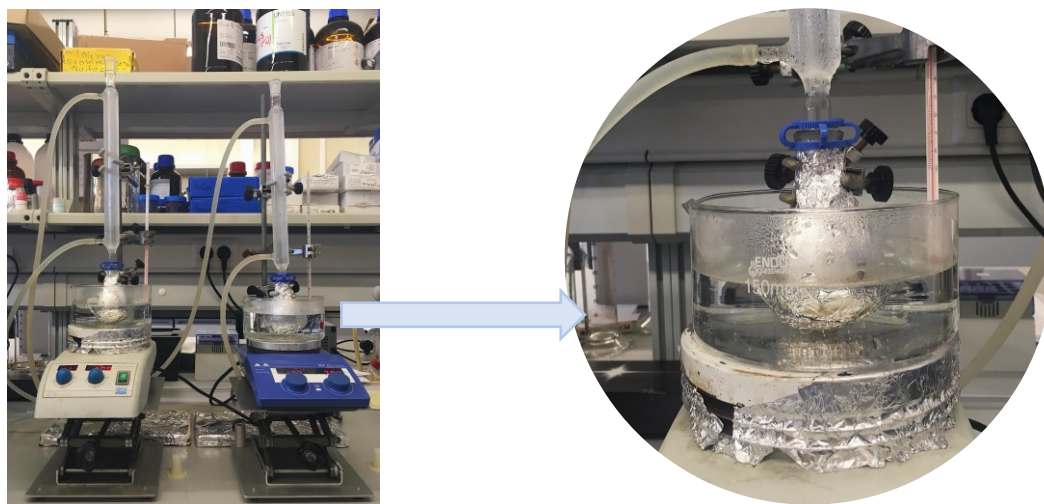


Figura A 1 - Montagem da extração sólido-líquido.



## Anexo B - Método para a microencapsulação do extrato rico em compostos fenólicos

A produção de micropartículas de etilcelulose (EC) carregadas com extrato rico em compostos fenólicos de bagaço de uva (BAUV) é realizada pela técnica de dupla emulsão água em óleo em água (A1/O/A2) por evaporação de solvente, conforme descrito por Paulo e Santos (2018a, 2018b, 2020b).

Para este fim, a solução correspondente à fase aquosa interna (A1) é preparada pela dissolução do extrato obtido em etanol 50%, considerando uma carga teórica de 10% (m/m). A carga teórica consiste na razão entre a massa de extrato adicionado e a soma da massa do polímero e a massa do extrato adicionados. O valor escolhido de carga teórica é amplamente encontrado na literatura como valor típico e é também o utilizado pelo grupo de investigação. Para formar a solução de polímero usada como fase oleosa (O), pesa-se 100 mg de EC e dissolve-se em 10 mL de diclorometano (1 min no vórtex e 5 min no banho de ultrassons). A fase aquosa externa (A2) deve ser previamente preparada (de preferência no dia anterior à realização da microencapsulação). Para tal, 1 g de álcool polivinílico (PVA) é dissolvido em 100 g de água ultrapura, sob agitação magnética, a cerca de 120 °C. Quando ocorre a dissolução total do PVA, a solução deve arrefecer à temperatura ambiente. A quantidade de água ultrapura evaporada durante o processo de dissolução do PVA deve ser adicionada antes da microencapsulação.

Para cada ensaio, 1 mL da solução A1 é adicionado à solução O, sendo posteriormente colocada no vórtex durante 3 min, para formar a emulsão primária A1/O. A emulsão obtida é dispersa em A2, e são emulsionadas usando um homogeneizador de alta *performance*, a 5000 rpm, durante 5 min. A evaporação do solvente e, o consequente endurecimento das micropartículas, é possível pela agitação contínua da dupla emulsão A1/O/A2 numa placa de agitação, a 700 rpm durante 3 h, na *hotte* (Figura B 1). As micropartículas são posteriormente recuperadas por filtração (filtro de 0,45 µm) e lavadas com 500 mL de água destilada para remover resíduos de PVA (Figura B 2). As micropartículas, após retiradas do filtro (Figura B 3), devem ser congeladas por 24 h a -20 °C e, posteriormente, liofilizadas (a -90 °C e à pressão de 10 mTorr durante 5 dias). Os ensaios devem ser realizados em triplicado.



Figura B 1 - Etapa de evaporação do solvente.

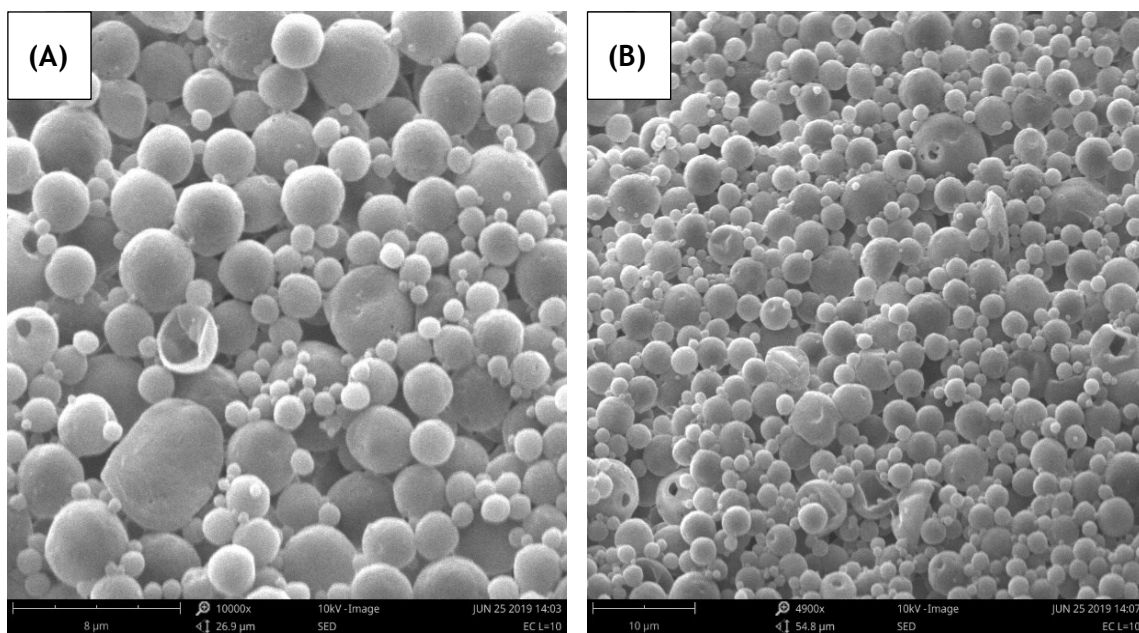


**Figura B 2** - Etapa de filtração, para recuperação das micropartículas.



**Figura B 3** - Micropartículas recuperadas no filtro.

## Anexo C - Morfologia das micropartículas



**Figura C 1** - Imagens obtidas no microscópio eletrônico de varrimento, de micropartículas de etilcelulose carregadas com extrato rico em compostos fenólicos de bagaço de uva (ampliação 10000x apresentada em (A) e 4900x apresentada em (B)). As imagens foram cedidas pelo mestre Sérgio Moreira.





## Anexo D - Estudos de libertação *in vitro* em fluidos gastrointestinais simulados

Tabela D 1 - Concentração dos eletrólitos para cada fluido gastrointestinal simulado (retirado de: (Minekus *et al.*, 2014).

Sal	Conc. Stock (g/L)	FSS	FGS	FIS
		Conc. (mmol/L)	Conc. (mmol/L)	Conc. (mmol/L)
KCl	37,3	15,1	6,9	6,8
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	68	3,7	0,9	0,8
NaHCO <sub>3</sub>	84	13,6	25	85
NaCl	117	-	47,2	38,4
MgCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub>	30,5	0,15	0,1	0,33
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	48	0,06	0,5	-

Nota: Conc. - concentração; FSS - fluido salivar simulado; FGS - fluido gástrico simulado; FIS - fluido intestinal simulado

Tabela D 2 - Procedimento experimental para os estudos de libertação *in vitro* (retirado de: (Minekus *et al.*, 2014).

Fluido gastrointestinal	Procedimento	Enzimas	Duração do ensaio	pH
FSS	FSS e enzimas 1:1 (V/V)	Amilase salivar (75 U/mL)	2 min	7
FGS	FGS e enzimas 1:1 (V/V)	Pepsina (2000 U/mL)	2 h	3
FIS	FIS e enzimas 1:1 (V/V)	Pancreatina <sup>a</sup> (100 U/mL) Sais bile (10 mM)	2 min	7

Nota: FSS - fluido salivar simulado; FGS - fluido gástrico simulado; FIS - fluido intestinal simulado; <sup>a</sup> com base na atividade da tripsina



## **Anexo E - Método *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses* (PRISMA)**

### **Estratégia de pesquisa**

Seguindo as diretrizes do método PRISMA (Moher *et al.*, 2009), foram realizadas duas revisões sistemáticas de estudos publicados: uma relativa à incorporação de extratos ricos em compostos fenólicos de BAUV em alimentos e outra referente à incorporação de micropartículas carregadas com os extratos referidos também em alimentos. Para as pesquisas recorreu-se à base de dados *Google Scholar*, e restringiu-se a procura a artigos em inglês, no período entre 2000 e 2020. Os seguintes termos de pesquisa foram usados: “*fortification grape pomace extract*” e “*fortification grape extract microencapsulation*”.

### **Triagem e seleção**

Os títulos dos artigos foram primeiro examinados, removendo-se posteriormente os artigos em duplicado. Caso os títulos indicassem possível inclusão para a revisão, o resumo e as conclusões eram lidas; em caso de dúvida, o artigo era lido na íntegra. Após esta avaliação cuidadosa, foram identificados os artigos considerados elegíveis para a revisão os que satisfizessem os seguintes critérios: (i) incorporação de extratos ricos em compostos fenólicos de BAUV em alimentos ou incorporação de micropartículas carregadas com extratos ricos em compostos fenólicos de BAUV em alimentos; (ii) estudo experimental e (iii) avaliação de pelo menos um parâmetro do produto alimentar enriquecido (como por exemplo, o teor fenólico total, a atividade antioxidante ou as propriedades sensoriais). Por outro lado, os estudos foram excluídos se (i) estudassem a incorporação de BAUV em pó; (ii) se estudassem a incorporação de nanopartículas ou (iii) caso fossem artigos de revisão ou resumos de conferências. As Figuras Figura E 1 e Figura E 2 correspondem aos diagramas de fluxo de informação através das diferentes fases da revisão sistemática, para a incorporação de extratos e de micropartículas em matrizes alimentares, respetivamente.

### **Recolha de dados**

Apenas foram recolhidos os dados relevantes à revisão, que no caso consistem nos objetivos de cada estudo e nos principais resultados obtidos. Os dados foram organizados em tabelas, e podem ser consultados nas Tabela 3 e Tabela 4.

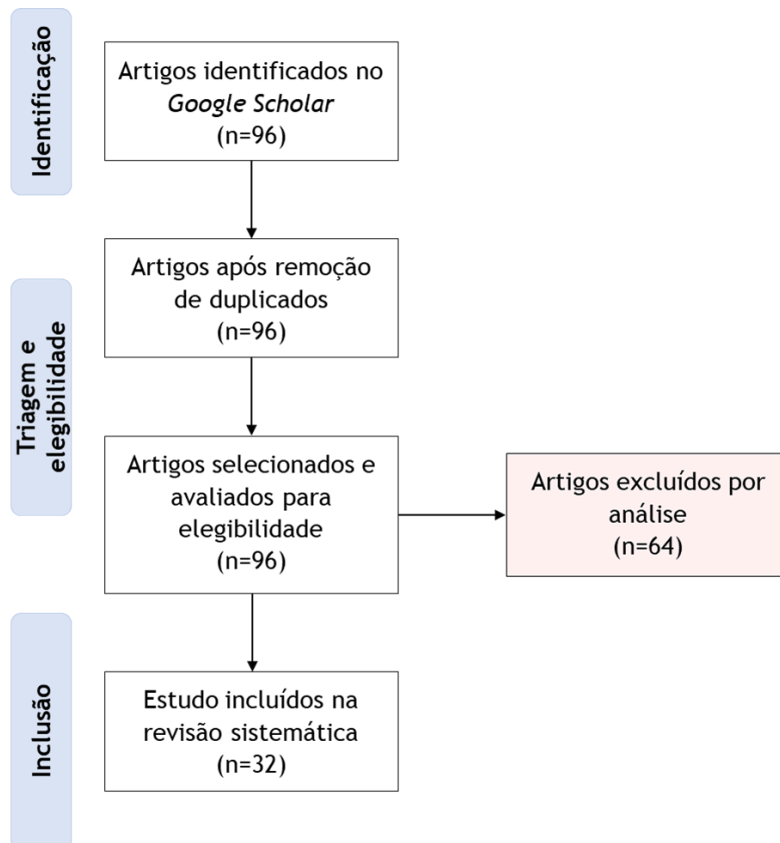


Figura E 1 - Diagrama de fluxo PRISMA da pesquisa sobre a incorporação de extratos ricos em compostos fenólicos de bagaço de uva em alimentos.

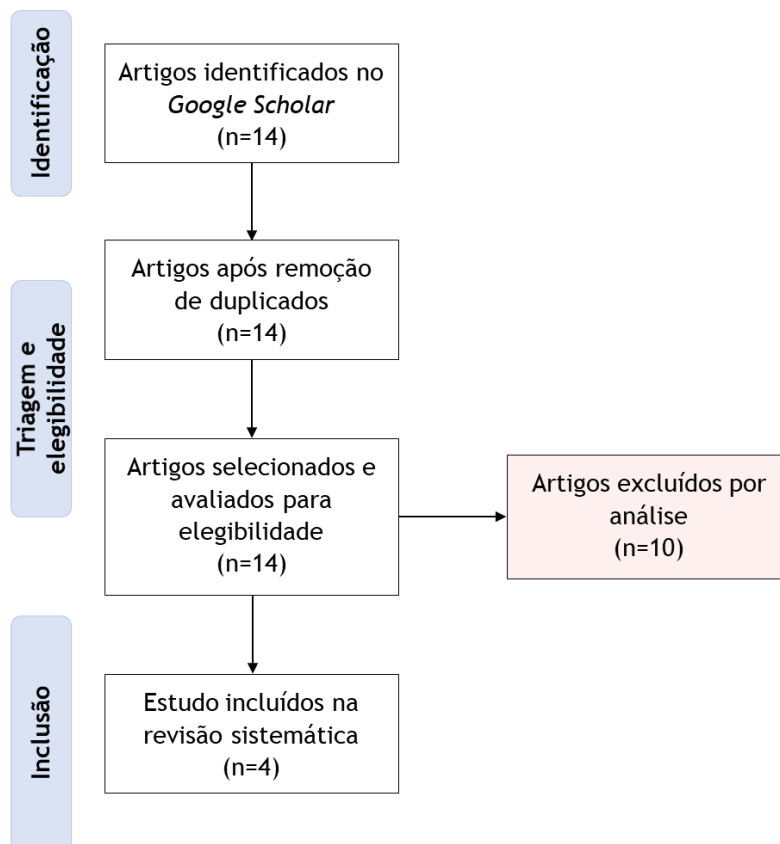


Figura E 2 - Diagrama de fluxo PRISMA da pesquisa sobre a incorporação de micropartículas carregadas com extratos ricos em compostos fenólicos de bagaço de uva em alimentos.

## Anexo F - Carta de Conforto/Apoio

QUEIJO  
**marinhas**<sup>®</sup>  
TRADICIONAL DESDE 1954

### A quem possa interessar

Chamo-me Berta Maria Bacelar de Castilho e sou sócia-gerente da Lacticínios das Marinhas, Lda, uma empresa de lacticínios nacional, situada na Avenida 19 de Agosto, 4399, em Marinhas, Esposende, com o NIF 500.162.441. Temos colaborado com a Prof. Lúcia Santos, da unidade de investigação do Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente, Biotecnologia e Energia (LEPABE) da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, no apoio à estudante de mestrado Raquel Gonçalves, no seu projeto de dissertação que visa a incorporação de micropartículas de extratos naturais em produtos lácteos.

A aplicação de micropartículas com compostos fenólicos de bagaço de uva em produtos lácteos, nomeadamente em queijo, representa um avanço na temática de exploração de resíduos e de fortificação de alimentos, seguindo a nossa tendência de desenvolver protocolos e inovações tecnológicas para transformar subprodutos em produtos de elevado valor acrescentado.

É com enorme prazer que confirmo o nosso interesse em continuar a colaborar com o LEPABE, nomeadamente no apoio ao presente projeto de dissertação.

Marinhas, 22 de Maio de 2020,

Lacticínios das Marinhas, Lda  
A Gerência





## Anexo G - Fluxograma da produção do queijo Marinhas

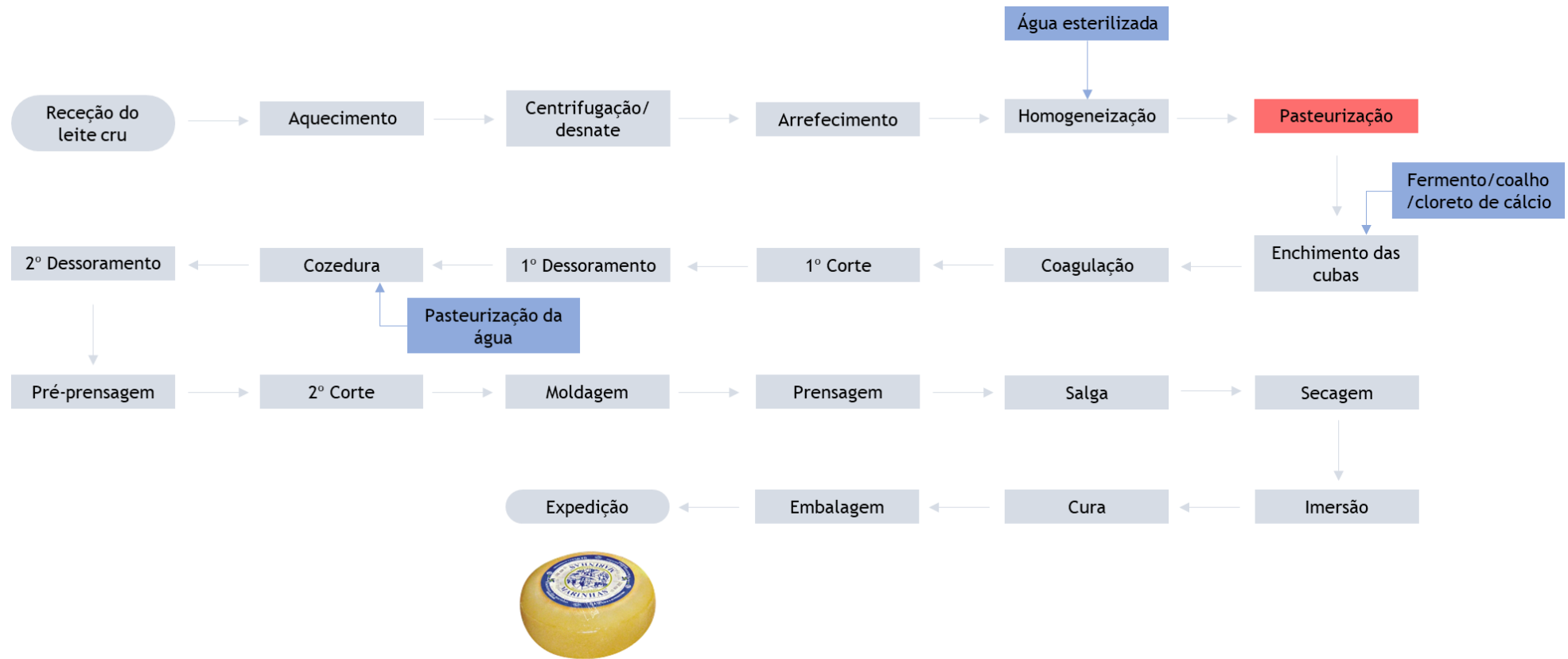


Figura F 1 - Fluxograma de produção do queijo Marinhas produzido na Lacticínios das Marinhas. A pasteurização indicada a vermelho representa o ponto crítico de controlo do processo.

