

Valorização dos biorresíduos de *Brassica oleracea* var. Acephala: avaliação química, nutricional e bioativa

Ana Luisa Silva Pepinelli

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

Orientado por:

Doutora Eliana Pereira

Doutora Lillian Barros

Professor Doutor Odinei Hess Golçalves

**Bragança
2022**

“Façamos nosso futuro agora e façamos nossos sonhos a realidade de amanhã”
Malala Yousafzai

Este trabalho foi financiado através do Sistema de Incentivos à Investigação e Desenvolvimento Tecnológico, no Programa Operacional Portugal2020 Competitividade e Internacionalização, no âmbito do projeto “*BIOMA – Bioeconomy integrated solutions for the mobilization of the Agro-food market*” (POCI-01-0247-FEDER-046112).



UNIÃO EUROPEIA
Fundo Europeu
de Desenvolvimento Regional

Agradecimentos

Exprimo aqui todos os meus sinceros agradecimento para aqueles que permitiram que essa dissertação se concretizasse, em especial:

Agradeço imensamente a Doutora Eliana Pereira por todo conhecimento transmitido, pela sua prontidão e dedicação para com este trabalho. Além de sua sensibilidade e cuidado. É graças ao seu incentivo e orientação que esta pesquisa se tornou possível.

Agradeço à Doutora Lillian Barros pelo tempo dedicado e pelo suporte oferecido.

Agradeço ao Professor Doutor Odinei Hess Gonçalves pela sua atenção e disposição.

Agradeço a Professora Doutora Fernanda Vitória Leimann, por ter acreditado no meu potencial e ter me direcionado nos meus primeiros passos acadêmico científico.

Agradeço a toda a minha família e meu namorado, que mesmo de longe sempre se fizeram muito presente e jamais mediram esforços para tornar essa conquista possível. Os meus maiores apoiadores, exemplos de muita dedicação e amor, carregou vocês em cada uma das minhas realizações.

Agradeço aos meus colegas de laboratório, durante a graduação e mestrado, por toda parceria e ajuda ao longo do desenvolvimento prático da pesquisa.

Agradeço aos doutorandos Tatiane, Junior e Bianca, pela paciência, disposição e por tanto terem me auxiliado em todas as etapas deste estudo.

Agradeço a todos os meus amigos, especialmente aos que se tornaram minha família em Bragança, por todo apoio emocional e estímulo. Jamais me esquecerei do quão valiosa foi a amizade e cumplicidade de vocês durante toda minha jornada.

Agradeço ao Instituto Politécnico de Bragança e à Universidade Tecnológica Federal do Paraná – CM por juntos, proporcionarem tamanha oportunidade e permitirem a realização deste trabalho.

Abreviaturas

A	Absorbância do controle
aw	Atividade de água
<i>a</i> *	Cromaticidade vermelho/verde
AAPH	Dicloridrato de 2,2'-Azobis (2-amidinopropano)
AGS	Adenocarcinoma gástrico
ANOVA	“Análise de variância”
AOAC	“Associação oficial de químicos analíticos”
B	Absorbância da solução do composto
<i>b</i> *	Cromaticidade azul/amarelo
CAA	“Atividade antioxidante celular”
CaCo	Adenocarcinoma colorretal
CE	“Equivalente de catequina”
<i>CIE</i>	“Comissão Internacional de Iluminação”
CMB	Concentração mínima bactericida
CMF	Concentração mínima fungicida
CMI	Concentração mínima inibitória
DAD	“Detector de díodos”
DCFH	2,7-diclorodihidrofluoresceína
DMEM	“Meio Eagle modificado por Dulbecco”
DMSO	Dimetilsulfóxido
DRBC	Ágar dicloran rosa bengala cloranfenicol
E200	Ácido sórbico
E211	Benzoato de sódio
E224	Metabissulfito de potássio
EC ₅₀	Concentração de extrato correspondente a 50% de atividade antioxidante
ECACC	“Coleção Europeia de Cultura de Células Animais”
ESI	“Fonte de ionização por espalhamento de elétrons”
FAO	“Organização das Nações Unidas para Alimentação e Alimentação”

FAME	“Éster metílico de ácidos gordos”
FID	“Detetor de ionização de chama”
<i>g</i>	Força <i>g</i> (unidade de rotação)
GAE	“Equivalente de ácido gálico”
GC	“Cromatografia gasosa”
GEE	Gases do efeito estufa
GI ₅₀	Concentração que inibe 50% do crescimento celular
HBSS	“Solução salina equilibrada de Hank”
HPLC	“Cromatografia líquida de alta eficiência”
IC ₅₀	Concentração que inibe 50% da produção de Óxido nítrico
INT	Cloreto de <i>p</i> -iodonitrotetrazólio
ISO	“Organização Internacional de Normalização”
<i>L*</i>	Luminosidade
LC	“Cromatografia Líquida”
LOQ	Limite de quantificação
LPS	Lipossacarídeos
MA	“Agar de malte”
MCF-7	Carcinoma da mama
MDA	Malodialdeído
<i>mf</i>	Massa fresca
MHB	“Ágar Müeller-Hinton”
MS	“Espectrometria de massa”
MYP	“Ágar Manitol Gema de Ovo Polimixina”
NCI-H460	Carcinoma do pulmão
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCA	“Agar de Contagem de Placas”
PDA	“Detector de fotodíodos”
pH	Potencial hidrogeniônico
PNUMA	Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente
<i>ppm</i>	Partes por milhão
RAW 264.7	Macrófago de monócitos de camundongo
RGB	"Vermelho, Verde e Azul"

RI	Infravermelho
<i>rpm</i>	Rotações por minuto
RPMI-1640	Meio Roswell Park Memorial Institute
SD	“Desvio padrão”
SFB	Soro Fetal Bovino
SRB	Sulforrodamina B
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	“Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico”
TCA	“Ácido tricloroacético”
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
Trolox	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
TSB	“Caldo de soja trípico”
UE	União Europeia
UFC	Unidade Formadora de Colônias
UFLC	“Cromatografia líquida de ultra eficiência”
UV-Vis	Radiação Ultravioleta-visível
VERO	Célula primária não tumoral
VRBLA	“Ágar Bile Vermelho Violeta Lactose”
v/v	volume/volume

Índice

Índice de Figuras	ix
Índice de Tabelas	xi
Índice de Equações	xii
Resumo	xiii
Abstract	xv
1 Introdução.....	1
1.1 Biorresíduos provenientes do setor agroindustrial.....	1
1.2 Valorização dos biorresíduos agroalimentares	3
1.3 Biorresíduos como fonte de compostos bioativos	5
1.3.1 Moléculas de interesse presentes nos biorresíduos	5
1.3.2 O caso particular dos compostos fenólicos	6
1.4 Subprodutos Alimentares: novas alternativas e possíveis aplicações na indústria	7
1.4.1 Ingredientes conservantes naturais.....	9
1.5 Brassica oleracea var. Acephala	9
1.5.1 Caracterização botânica, origem e produção.....	9
1.5.2 Composição nutricional e química.....	11
1.5.3 Aplicações e benefícios.....	14
2 Objetivos	15
3 Material e métodos	17
3.1 Amostra.....	17
3.2 Padrões e reagentes	17
3.2.1 Análise química e nutricional.....	17
3.2.2 Estudo das bioatividades	18
3.3 Determinação do valor nutricional dos bioresíduos de B. oleracea var. Acephala	18
3.4 Determinação da composição química dos bioresíduos de B. oleracea var. Acephala	20
3.4.1 Açúcares	20
3.4.2 Ácidos orgânicos	22
3.4.3 Ácidos gordos.....	23
3.4.4 Fenois e Flavonóides totais	24

3.5	Avaliação das propriedades bioativas do extrato hidroetanólico obtido a partir dos bioresíduos de <i>B. oleracea</i> var. <i>Acephala</i>	25
3.5.1	Extração da amostra por maceração.....	26
3.5.2	Atividade antimicrobiana.....	26
3.5.2.1	Atividade antibacteriana.....	26
3.5.2.2	Atividade antifúngica.....	27
3.5.3	Avaliação da citotoxicidade e toxicidade.....	28
3.5.4	Avaliação da atividade anti-inflamatória.....	29
3.5.5	Avaliação da atividade antioxidante.....	30
3.5.5.1	TBARS.....	30
3.5.5.2	Avaliação da atividade antioxidante celular (CAA).....	32
3.5.6	Incorporação do extrato rico em compostos fenólicos num produto de padaria.....	32
3.5.7	Preparação do produto de pastelaria – Pão de leite.....	33
3.5.8	Avaliação dos parâmetros físicos dos pães de leite.....	36
3.5.9	Avaliação do valor nutricional das amostras de pão de leite.....	39
3.5.10	Avaliação da atividade de água das amostras de pão de leite.....	39
3.5.11	Avaliação da carga microbiana das amostras de pão de leite.....	39
3.6	Análise estatística.....	42
4	Resultados e discussão.....	43
4.1	Análise nutricional dos biorresíduos da <i>B. oleracea</i> var. <i>Acephala</i>	43
4.2	Análise química dos biorresíduos da <i>B. oleracea</i> var. <i>Acephala</i>	44
4.3	Avaliação das propriedades bioativas do extrato hidroetanólico da <i>B. oleracea</i> var. <i>Acephala</i>	50
4.3.1	Atividade antioxidante.....	50
4.3.2	Atividade anti-inflamatória e citotóxica.....	51
4.3.3	Atividade antimicrobiana.....	52
4.4	Estudo de incorporação do ingrediente natural obtido a partir dos biorresíduos de <i>B. Oleracea</i> var. <i>Acephala</i> em pães de leite.....	54
4.4.1	Avaliação dos parâmetros físicos.....	54
4.4.2	Avaliação dos parâmetros nutricionais.....	60
4.4.3	Avaliação da carga microbiana.....	61
4.5	Considerações finais e perspectivas futuras.....	63
5	Referências bibliográficas.....	65

Índice de Figuras

Figura 1 - Economia circular	4
Figura 2 - Hierarquia dos resíduos	4
Figura 3 - <i>Brassica oleracea</i> var. <i>Acephala</i>	10
Figura 4 - Figura representativa da produção mundial de couve e outras brássicas em 2020	11
Figura 5 - Representação esquemática dos objetivos da dissertação.....	16
Figura 6 - Biorresíduos de couve galega liofilizado.....	17
Figura 7 - Equipamentos utilizados para a determinação do teor de proteínas	19
Figura 8 – Equipamento utilizado para a determinação do teor de lipídios (soxhlet)	19
Figura 9 – Amostra após incineração em mufla.....	20
Figura 10 - Procedimento experimental para determinação dos Açúcares – Duas fases aparentes após lavagem com éter dietílico (A), Tubo contendo a primeira fase após separação (B).....	21
Figura 11 – Amostra após filtragem.....	23
Figura 12 – Análise de fenóis totais – Intensidade da cor do extrato de couve galega (A) e microplaca contendo a reta de calibração (Ác. Gálico) e extrato de couve galega (B)	24
Figura 13 - Análise de flavonóides – Intensidade da cor na solução padrão de catequina (A) e intensidade da cor do extrato de couve galega (B).....	25
Figura 14 - Ensaio de avaliação da atividade antioxidante TBARS.....	31
Figura 15 - Produto final – pão de leite inteiro. Amostra controlo T = 0 dias (A) T= 3 dias (D), amostra com adição de extrato natural T = 0 dias (B) T= 3 dias (E); amostra com adição de ácido sórbico T = 0 dias (C) T= 3 dias (F) (Fonte: Ana Luisa Pepinelli, 2022).	34
Figura 16 - Produto final – pão de leite cortado. Amostra controlo T = 0 dias (A) T= 3 dias (D), amostra com adição de extrato natural T = 0 dias (B) T= 3 dias (E); amostra com adição de ácido sórbico T = 0 dias (C) T= 3 dias (F) (Fonte: Ana Luisa Pepinelli, 2022).	35
Figura 17 - Pães embalados individualmente em sacos transparentes	35
Figura 18 – Equipamento utilizado para medição da cor nas amostras de pão de leite	36
Figura 19 - Modelo das coordenadas tridimensionais da cor	37

Figura 20 - Medição do pH das amostras	38
Figura 21 – Equipamento utilizado para avaliação de textura – texturômetro.....	38
Figura 22 – Medidor de atividade de água	39
Figura 23 – Procedimentos para análise microbiana - Aparelho Stomacher (A) e espalhamento em meio sólido (B)	41
Figura 24 - Crescimento microbiano – Mesófilos totais (A), Coliformes (B), Bolores e leveduras (C) e <i>Bacillus cereus</i> (D) (Fonte: Ana Luisa Pepinelli, 2022).....	41
Figura 25 – Cromatograma dos açúcares – Frutose (1), Glicose (2), Sacarose (3) e Melezitose (PI) (4).....	45
Figura 26 – Cromatograma dos ácidos orgânicos a 215 e 245nm– Oxálico (1), Málico (2), Cítrico (3), Fumárico (4) e Ascórbico (5).....	46
Figura 27 – Cromatograma dos ácidos gordos - Ácido palmítico (1); Ácido esteárico (2); Ácido α -linoleico (3); Ácido linolênico (4); Desconhecido (5)	46
Figura 28 – Gráficos do crescimento microbiano	62

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Desperdício alimentar global.....	1
Tabela 2 – Definição de perda e desperdício alimentar.....	2
Tabela 3 - Estudos da extração de bioativos em bioresíduos de <i>Brassica</i>	6
Tabela 4 - Composição nutricional da couve numa porção de 100g (massa fresca). 12	
Tabela 5 - Compostos fenólicos e suas estruturas presentes na couve galega	13
Tabela 6 – Composição nutricional dos biorresíduos de couve galega; (média ± DP) .	43
Tabela 7 - Composição em açúcares, ácidos orgânicos e ácidos gordos dos biorresíduos de <i>B. oleracea</i> var. <i>Acephala</i> ; (média ± DP).....	45
Tabela 8 – Atividade citotóxica, toxicidade e atividade anti-inflamatória do extrato hidroetanólico obtido a partir dos bioresíduos de <i>B. oleracea</i> var. <i>Acephala</i>	51
Tabela 9 - Atividade antibacteriana (CMI e CMB mg/mL) e antifúngica (CMI e CMF mg/mL) do extrato obtido a partir dos bioresíduos de <i>B. Oleracea</i> . var <i>acephala</i> . 53	
Tabela 11 – Avaliação da textura nas amostras de pão, durante os tempos de armazenamento 0 e 3 dias.....	55
Tabela 12 – Avaliação dos parâmetros de cor das amostras de pão durante os tempos de armazenamento T0 e T3 dias.....	58
Tabela 13 – Avaliação do pH das amostras de pão durante os tempos de armazenamento T0 e T3 dias.	59
Tabela 14 - Avaliação da atividade de água das amostras de pão durante os tempos de armazenamento T0 e T3 dias.....	60
Tabela 10 – Avaliação do perfil nutricional das amostras de pão durante os tempos de armazenamento T0 e T3 dias.....	61

Índice de Equações

Equação 1 - Equação para determinação de hidratos de carbono..... 20

Equação 2 - Equação para determinação da energia total. 20

Equação 3 - Equação da determinação da taxa de inibição em ensaio TBARS..... 31

Equação 4 - Diferença total de cor entre os tempos 0 e 3 dias. 37

Resumo

A indústria alimentar é responsável pela produção de bilhões de toneladas de alimentos, em que uma grande parte, são perdidos ou desperdiçados como resíduos. Esses resíduos são fontes ricas em compostos fenólicos que lhes atribuem boas propriedades biológicas, principalmente antimicrobiana e antioxidante. Este potencial torna viável o reaproveitamento e valorização destes resíduos, contribuindo para o crescimento da economia circular e sustentabilidade do setor agroalimentar.

A *Brassica oleracea* var. *Acephala*, popularmente conhecida como couve galega, é um alimento amplamente apreciado e consumido, que tem chamado à atenção da comunidade científica devido ao seu elevado valor nutricional. Particularmente rica em vitaminas, minerais e fibras alimentares, a couve galega também se destaca pelo seu potencial bioativo, contendo compostos fenólicos.

Desta forma, o presente estudo objetivou a caracterização do perfil nutricional, químico e a ação biológica da couve galega, assim como a obtenção de um extrato rico em fenóis e flavonóides, que foi incorporado numa matriz alimentar (pães de leite) para avaliar seu desempenho como conservante.

O valor nutricional (gordura, proteína, cinzas e energia) da amostra foi determinado utilizando as metodologias oficiais de análise de alimentos (AOAC). A composição química da amostra foi feita através da determinação do perfil em açúcares livres por HPLC-RI, dos ácidos gordos por GC-FID, dos ácidos orgânicos por UFLC-PDA e foram determinados também a quantidade de fenóis e flavonóides totais, através de métodos espectrofotométricos. O potencial bioativo do extrato foi avaliado através de ensaios *in vitro* e testadas as atividades citotóxica, anti-inflamatória, antimicrobiana e antioxidante.

Na amostra de couve galega foram identificados frutose, glucose e sacarose, destacando-se a glucose como o principal açúcar livre presente na amostra. Também foram identificados os ácidos oxálico, málico, ascórbico, cítrico e fumárico, sendo os ácidos málico e cítrico os mais abundantes. O perfil de ácidos gordos revelou a presença de cinco compostos, tendo sido os ácidos gordos poli-insaturados os que apresentaram maior concentração, destacando-se o ácido linolénico como maioritário. Quanto à composição de fenóis e flavonóides totais, o extrato revelou possuir uma quantidade promissora destes compostos. O potencial bioativo foi avaliado através da atividade

antioxidante pelas metodologias TBARS e CAA; a atividade antimicrobiana foi determinada pelo método de microdiluição utilizando isolados clínicos de bactérias Gram-positivos e Gram-negativos e estirpes de fungo; a citotoxicidade foi testada em quatro linhas de células tumorais humanas (AGS, CaCo, MCF-7, NCI-H460) e numa cultura de células primárias não tumoral (VERO), utilizando o ensaio de sulforrodamina B.; a atividade antiinflamatória foi determinada em células RAW 264,7.

Com base nos valores obtidos, foi demonstrada a presença de ação antioxidante. Também a atividade antimicrobiana revelou resultados promissores, com bons efeitos bacteriostáticos e fungistáticos. Relativamente à avaliação citotóxica e anti-inflamatória, o extrato não apresentou atividade nas concentrações testadas, não tendo, também, apresentado toxicidade.

Relativamente ao poder conservante do extrato de couve galega nos pães de leite, este foi avaliado ao longo do tempo (0 e 3 dias). Foram realizadas análises físicas (textura, cor, pH, atividade da água), nutricionais (proteínas, gorduras, hidratos de carbono, cinzas e energia), e de avaliação da carga microbiana. A amostragem foi composta pelos pães de leite funcionalizados com extrato de couve galega, pelos pães de leite com aditivo sintético comumente aplicado pela indústria alimentar (ácido sórbico) e pelos pães de leite controlo (sem qualquer ingrediente ou aditivo).

Os resultados obtidos com a incorporação revelaram alterações no perfil físico, nutricional e na carga microbiana em todas as amostras, mostrando de que forma as diferentes incorporações podem afetar o produto alimentar original.

Neste contexto, a valorização dos biorresíduos da couve apresenta-se não só como uma alternativa industrial, quando levado em conta o aproveitamento de subprodutos e agregação de valor perdido, mas também uma solução quanto a diminuição da quantidade de aditivos artificiais usados no setor alimentar, apresentando equivalentes naturais como possíveis substituintes.

Palavras-chave: *Brassica oleracea* var. *Acephala*; Bioatividade; Compostos fenólicos; Atividade biológica; Conservante natural.

Abstract

The food industry is responsible for producing billions of tons of food, a large part of which is lost or wasted as waste. These residues are rich sources of phenolic compounds that give them good biological properties, mainly antimicrobial and antioxidant. This potential makes the reuse and recovery of these residues viable, contributing to the growth of the circular economy and sustainability of the agri-food sector.

Brassica oleracea var. *Acephala*, popularly known as kale, is a widely appreciated and consumed food, which has drawn the attention of the scientific community due to its high nutritional value. Particularly rich in vitamins, minerals and dietary fiber, kale also stands out for its bioactive potential, containing phenolic compounds.

Therefore, the present study aimed to characterize the nutritional, chemical and biological action of kale, as well as to obtain an extract rich in phenols and flavonoids, which was incorporated into a food matrix to evaluate its performance as a preservative. The nutritional value (fat, protein, ash and energy) of the sample was determined using official food analysis methodologies (AOAC). The chemical composition of the sample was made by determining the profile of free sugars by HPLC-RI, of fatty acids by GC-FID, of organic acids by UFLC-PDA and the amount of phenols and total flavonoids were also determined by spectrophotometric. The bioactive potential of the extract was evaluated through in vitro assays and tested for cytotoxic, anti-inflammatory, antimicrobial and antioxidant activities.

In the kale sample, fructose, glucose and sucrose were identified, with glucose being the main free sugar present in the sample. Oxalic, malic, ascorbic, citric and fumaric acids were also identified, with malic and citric acids being the most abundant. The fatty acid profile revealed the presence of five compounds, with polyunsaturated fatty acids being the ones with the highest concentration, with linolenic acid standing out as the majority. As for the composition of total phenols and flavonoids, the extract is revealed to have a promising amount of these compounds. The bioactive potential was evaluated through the antioxidant activity by the TBARS and CAA methodologies; antimicrobial activity was determined by the microdilution method using clinical isolates of Gram-positive and Gram-negative bacteria and fungus strains; cytotoxicity was tested on four human tumor cell lines (AGS, CaCo, MCF-7, NCI-H460) and on a non-tumor primary

cell culture (VERO) using the sulforhodamine B assay; anti-inflammatory activity was determined in RAW 264.7 cells.

Based on the values obtained, the presence of antioxidant action was demonstrated. Also, the antimicrobial activity revealed promising results, with good bacteriostatic and fungistatic effects. Regarding the cytotoxic and anti-inflammatory evaluation, the extract did not show activity at the concentrations tested, nor did it show toxicity.

Regarding the preservative power of kale extract in milk bread, it was evaluated over time (0 and 3 days). Physical (texture, color, pH, water activity), nutritional (protein, fat, carbohydrate, ash and energy) and microbial load analysis were performed. The sampling consisted of milk breads functionalized with kale extract, milk breads with a synthetic additive commonly applied by the food industry (sorbic acid) and control milk breads (without any ingredient or additive).

The results obtained with the incorporation revealed changes in the physical and nutritional profile and in the microbial load in all samples, showing how the different incorporations can affect the original food product.

In this context, the recovery of cabbage bio-waste presents itself not only as an industrial alternative, when taking into account the use of by-products and added value lost, but also a solution for reducing the amount of artificial additives used in the food sector, presenting natural equivalents as possible substituents

Keywords: *Brassica oleracea* var. *Acephala*; Bioactivity; Phenolic compounds; Biological activity; Natural preservative.

1 Introdução

1.1 Biorresíduos provenientes do setor agroindustrial

Milhões de toneladas de resíduos alimentares são gerados ao longo da cadeia produtiva no setor agroindustrial. Estes resíduos referem-se aos alimentos próprios para o consumo humano que são retirados da cadeia como resultado da ineficiência dos sistemas produtivos ou por negligência (Jesus & Pires, 2018).

De acordo com o Índice de desperdício alimentar do PNUMA de 2021, em 2019 cerca de 931 milhões de toneladas de resíduos alimentares foram gerados. A **Tabela 1** apresenta a estimativa do desperdício alimentar global gerado por setores, sendo que o de agregados familiares ocupa a primeira posição, responsável por cerca de 61% dos desperdícios (Programa das Nações Unidas para o Ambiente, 2021).

Tabela 1 - Desperdício alimentar global.

Setor	Média de desperdício alimentar global [Kg/capita/ano]	Total 2019 [milhões de toneladas]
Agregado familiar	74	569
Serviços alimentares	32	244
Retalho	15	118
Total	121	931

Fonte : (Programa das Nações Unidas para o Ambiente, 2021)

No geral, a produção de resíduos alimentares está associada ao desperdício de alimentos e às perdas na produção (Silva, 2018). Sendo que em todas as etapas da cadeia alimentar são abordados os conceitos de perda e desperdício, que estão explicadas e exemplificadas na **Tabela 2**.

Tabela 2 – Definição de perda e desperdício alimentar.

	Definição	Ocorrência	Exemplos
Perda	A diminuição da quantidade ou qualidade dos alimentos resultantes de decisões e ações de fornecedores durante o abastecimento da cadeia	Pós-colheita, Processamento e distribuição	Danos durante o transporte, armazenamento ineficiente, manuseio inadequado.
Desperdício	A diminuição da quantidade ou qualidade dos alimentos resultantes de decisões e ações pelos varejistas, serviços alimentares e consumidores	Retalho e consumo (lares e serviços alimentares)	Alimentos não consumidos descartados no quotidiano doméstico e em restaurantes, Produto que é descartado porque não atende aos padrões de comercialização.

Fonte: (FAO, 2020)

Os resíduos provenientes do setor agroindustrial enquadram-se como as perdas durante o processo de industrialização que englobam desde a colheita até a distribuição. Os principais resíduos gerados pela agroindústria são os resíduos sólidos orgânicos (Gaspar et al., 2020). Estes resíduos oriundos das unidades de transformação de alimentos são considerados biorresíduos, que segundo o Decreto-Lei n.º 102-D/2020 de 10 de Dezembro, entende-se por “*resíduos biodegradáveis de jardins e parques, os resíduos alimentares e de cozinha das habitações, dos escritórios, dos restaurantes, dos grossistas, das cantinas, das unidades de catering e retalho e os resíduos similares das unidades de transformação de alimentos.*”

As frutas e vegetais destacam-se por serem um dos produtos agroindustriais de origem vegetal mais produzidos mundialmente e, principalmente, por ser o grupo de alimentos que apresenta a maior quantidade de perda e desperdício (Caldeira et al., 2019; Júnior, 2020). Isto deve-se por serem tecidos vivos com metabolismo ativo e sujeitos a mudanças contínuas depois da colheita, quando expostos a condições inadequadas

(temperatura e umidade) mesmo que por um curto período podem sofrer uma queda sensível na qualidade, suficiente para impedir a sua utilização e comercialização (Spagnol et al., 2018).

Em 2019, a produção total mundial de frutas foi de 868 milhões de toneladas e de vegetais foi de 1 089 milhões de toneladas, contudo estima-se que 50% desta produção é perdida desde a colheita até a chegada ao mercado. Esta perda também relaciona-se com todo o desperdício de insumos, terras, água, energia entre outros recursos que são utilizados para cultivar (FAO, 2020). Como consequência da alta demanda alimentar, tornou-se crescente a exploração dos recursos naturais e o aumento da quantidade de biorresíduos gerados e acumulados no meio ambiente (Costa Filho, 2017). A produção destes biorresíduos acarretam em grandes impactos ambientais como a emissão de gases com efeito de estufa (GEE), estima-se que de 8% a 10% da emissão global destes gases estão aliados a alimentos que não são consumidos (Programa das Nações Unidas para o Ambiente, 2021).

Mesmo sendo prejudicial para o meio ambiente, a principal via de destinação dos biorresíduos são os aterros, sendo que em 2020, obteve-se um total de 64% de resíduos depositados em aterro em função do total dos resíduos produzidos em Portugal Continental (Agência Portuguesa do Ambiente, 2021). Portanto, o desvio dos biorresíduos de aterros para vias alternativas que visam a não excessiva geração e valorização dos mesmos, torna-se uma estratégia para a diminuição dos impactos no meio ambiente e para um melhor aproveitamento dos recursos naturais.

1.2 Valorização dos biorresíduos agroalimentares

A necessidade de utilização dos recursos de forma mais correta e eficiente, a redução do desperdício desnecessário, a modificação das pautas de produção a fim de obter o máximo aproveitamento dentro da cadeia produtiva e o melhor consumo e gestão dos resíduos são fatores contribuintes para a economia circular, que propõe que os materiais sejam utilizados visando a maximização do seu valor, reduzindo a geração de resíduos e gerando benefícios econômicos concomitantes aos ambientais (Humana Portugal, 2019; Ribeiro & Kruglianskas, 2014). O modelo da economia circular é ilustrado pela **Figura 1**.



Figura 1- Economia circular
(Fonte: Allen, 2018).

As estratégias já utilizadas de gestão dos resíduos não contribuem necessariamente com a economia circular, portanto, é necessário a adoção de novas que visam principalmente a prevenção e redução (Morsetto, 2020). A hierarquia dos resíduos apresentada na **Figura 2** estabelece uma ordem de prioridades quanto as melhores alternativas de gestão; sendo as ações, de maior para a menor preferência, são: prevenção e redução, reutilização, reciclagem, valorização e eliminação.



Figura 2 - Hierarquia dos resíduos
(Fonte: Agência Portuguesa do Ambiente, 2019).

Quando os alimentos não servem mais para o consumo humano, algumas opções como valorização e reciclagem devem ser consideradas. A reciclagem inclui opções que podem dar origem a produtos de alto valor agregado contribuindo com a valorização e evitando assim a produção destes resíduos. Com foco na extração e recuperação de compostos potencialmente valiosos, esta opção pode contribuir para a conversão da matéria que seria eliminada em produtos fonte de bioativos (European Commission Joint Research Centre, 2020).

1.3 Biorresíduos como fonte de compostos bioativos

Particularmente ricos em compostos bioativos, os biorresíduos hortícolas não são apenas as matérias primas que apresentam danos físicos ou químicos acabando por não se enquadrar nas características padrão de comercialização, mas incluem também pele, sementes, cascas, talos, entre outras partes não edíveis que são descartadas durante as operações de preparação. (Baeta, 2014). Estes resíduos podem ser utilizados para a recuperação de moléculas altamente valiosas (Raiola et al., 2018).

1.3.1 Moléculas de interesse presentes nos biorresíduos

Dependendo das matérias-primas e do processamento a partir do qual são produzidos, os biorresíduos podem conter diferentes níveis de nutrientes (proteínas, lipídios, minerais, carboidratos) e também de compostos funcionais de alto valor (vitaminas, carotenoides, polifenóis, péptidos, polissacarídeos) (Pintado & Teixeira, 2015). Vários estudos têm sido realizados no sentido de avaliar e determinar o perfil nutricional e o potencial bioativo de diversas matérias primas descartadas pela indústria, mostrando resultados satisfatórios quanto a obtenção de compostos de elevado valor. Com enfoque nos resíduos de *Brassica*, alguns estudos estão representados na **Tabela 3**.

Tabela 3 - Estudos da extração de bioativos em bioresíduos de *Brassica*.

Molécula de interesse	Biorresíduo	Método de extração	Referência
Carotenóides	<i>Brassica rapa</i> ssp. Chinensis (Couve Chinesa)	Solução de Metanol	(Neugart et al., 2018)
Glucosinalatos	<i>Brassica rapa</i> ssp. Chinensis (Couve Chinesa)	Agitação com metanol quente	(Neugart et al., 2018)
Compostos fenólicos	<i>Brassica rapa</i> ssp. Chinensis (Couve Chinesa)	Ultrassom seguido de agitação	(Neugart et al., 2018)
Vitamina C	<i>Brassica oleracea</i> var. Italica (brócolis), <i>Brassica oleracea</i> var. Botrytis (Couve-flor), <i>Brassica oleracea</i> var. acephala (Couve galega)	Solução de extração contendo ácido metafosfórico e ácido acético	(Lafarga et al., 2018)
Fibras	<i>Brassica napus</i> L. (Canola)	Soxhlet utilizando éter como solvente.	(Rodrigues et al., 2021)
Antocianinas	<i>Brassica oleracea</i> L., convar. capitata (L.) Alef, var. rubra DC (Repolho roxo)	Solvente com agitação	(Patras, 2019)

Contudo, diversos investigadores tem associado os materiais não edíveis, produzidos pelo processamento de hortaliças, ricos em compostos bioativos podendo ser utilizados como fonte de antioxidantes (Baptista et al., 2021).

1.3.2 O caso particular dos compostos fenólicos

Os compostos fenólicos estão entre as maiores classes de de compostos bioativos. São definidos como substâncias cuja estrutura possui um ou mais anéis aromáticos, o qual se encontra ligado a um ou mais substituintes hidroxílicos (Sagar et al., 2018). Estes compostos apresentam elevada atividade antioxidante, isto deve-se principalmente à sua estrutura química e propriedades de oxirredução que desempenham um importante papel na absorção e neutralização de radicais livres (Zardo, 2019), ou seja, podem prevenir a

oxidação das biomoléculas eliminando os radicais livres produzidos durante as reações redox (Baptista et al., 2021).

As propriedades antioxidantes exibidas por muitos vegetais deve-se, principalmente, aos compostos fenólicos. Estes são produtos derivados do metabolismo secundário dos vegetais e atribui nas plantas aspectos sensoriais (cor, aroma, adstringência e sabor) e função de proteção contra estresse oxidativo, radiação ultravioleta e conferindo alta resistência a microrganismos e pragas. Dentre os compostos com potencial atividade antioxidante estão: vitamina C, carotenóides, clorofilas, e uma variedade de antioxidantes fitoquímicos como compostos fenólicos simples, glicosídeos e flavonóides (Araújo et al., 2021; Lopes, 2015; Rocha et al., 2011; Silva et al., 2022).

Para além de influenciarem na proteção das plantas e estarem ligados a aspetos sensoriais, os compostos fenólicos com função antioxidante também desempenham nos alimentos o importante papel de ajudar a prevenir ou retardar o desenvolvimento da rancidez oxidativa, que é responsável pela deterioração de produtos. Neste sentido a incorporação de agentes antioxidantes naturais prolonga a vida útil dos produtos alimentares (Galanakis, 2012; J. A. da Silva, 2018).

1.4 Subprodutos Alimentares: novas alternativas e possíveis aplicações na indústria

Um dos principais desafios que a indústria alimentar enfrenta é a preservação dos seus produtos. As grandes necessidades alimentares, aliadas ao consumismo e à competitividade do mercado global, levam à escolha do método de conservação de alimentos mais barato. Desta forma, são aplicados diferentes processos como refrigeração, secagem, congelamento e aquecimento, ou ainda o método mais comum de conservação e melhoramento de produtos alimentares, a adição de aditivos alimentares (Arias, 2019).

Os aditivos são, comumente, utilizados não só para manter as características organolépticas, mas também, para prevenir e até mesmo inibir quaisquer alterações nos alimentos provocadas por microrganismos ou enzimas, evitando assim alterações que sejam indesejáveis e mantendo a qualidade dos produtos, a fim de prolongar a sua vida útil e facilitar processos como embalagem e transporte dos alimentos. (Carocho et al., 2015).

A legislação da UE define 27 classes funcionais de aditivos alimentares, sendo algumas delas os acidificantes, conservantes, corantes, humidificantes, espessantes, gelificantes, estabilizadores, entre outras (DGAV, 2022).

Aditivos conservantes são substâncias que impedem ou retardam alterações provocadas nos alimentos por microrganismos ou enzimas. Podem atuar como antioxidantes, que são substâncias que retardam o aparecimento de alterações oxidativas nos alimentos; e como antimicrobianos, que são utilizadas para controlar a contaminação por microrganismos incluindo os patogênicos. A letra utilizada para a identificação desses conservantes é a E, e o intervalo numérico vai de E200 ao E399 (Silva et al., 2019).

Estes métodos de conservação por incorporação de aditivos, apesar de apresentar eficiência quanto a não deterioração do produto e custos reduzidos para a indústria, podem também ser prejudiciais, visto que quando consumidos durante um longo período de tempo ou em doses superiores à dose determinada pelos órgãos controladores, podem vir a causar alguns problemas de saúde ao ser humano, como toxicidade e potenciais alergias (Vincenzi et al., 2021).

O uso de aditivos nos alimentos é controlado baseado na sua avaliação toxicológica e tendo em conta aspectos como efeito acumulativo, sinérgico e de proteção. A sua aplicação é limitada a um determinado tipo de alimentos, em condições específicas e ao menor nível para alcançar o efeito desejado, e as concentrações utilizadas devem ser administradas de forma a que a sua ingestão diária não ultrapasse os valores de ingestão diária aceitável (IDA). Para além disso, devem atender às exigências de pureza estabelecidas pela FAO-OMS ou pelo *Food Chemical Codex*. A indústria alimentar é obrigada a seguir todas as restrições impostas relativas ao uso destes aditivos (Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária, 1997).

A ampla utilização de aditivos pela indústria de alimentos acarreta uma enorme distribuição de produtos contendo estes compostos sendo rotineira o consumo e compra. Apesar de toda acessibilidade, os consumidores estão cada vez mais exigentes quanto ao consumo de produtos mais saudáveis, com elevada qualidade e sem vestígios de aditivos que podem vir a ser prejudiciais à saúde (Arias, 2019). Neste sentido, é necessária a busca de substâncias de origem natural que atendam às exigências do mercado consumidor e que consigam dar uma resposta eficiente ao setor industrial para serem utilizadas no processamento de alimentos (Galo et al., 2018).

1.4.1 Ingredientes conservantes naturais

Muitos estudos demonstram que bioativos derivados de plantas, como os compostos fenólicos, podem inibir o crescimento e a atividade de vários microrganismos, incluindo fungos, leveduras e bacteriás gram positivas e gram negativas (Favela-González et al., 2020). Devido sua estrutura molecular diversificada e sua composição química, estes compostos podem exercer efeitos antimicrobianos diferentes como a inibição de enzimas extracelulares e desestabilização da membrana de plasma podendo servir como fonte de agente antimicrobiano para a indústria alimentar (Le et al., 2020).

A utilização de bioconservantes como os compostos fenólicos em alimentos é uma oportunidade para a aplicação de suas atividades biológicas, que proporciona um efeito protetor contra deterioração, e permite a produção de alimentos sem aditivos sintéticos tornando-o mais seguro para os consumidores. O principal métodos de aplicação dos compostos fenólicos é sua adição direta no produto alimentar (Martillanes et al., 2017).

Esta adição de compostos fenólicos direta no produto pode ser feita de diversas formas, como microcápsulas, farinha, extratos e óleos. A incorporação na forma de extrato vem sendo estudada e amplamente aplicada em produtos alimentares por apresentar elevados teores de compostos bioativos recuperados a partir da matéria vegetal e pela sua atuação em preservar alimentos frescos e processados (Raphael et al., 2021).

1.5 Brassica oleracea var. Acephala

1.5.1 Caracterização botânica, origem e produção

A *Brassica oleracea* var. *Acephala*, **Figura 3**, popularmente conhecida como couve galega, é uma hortaliça folhosa, pertencente a família *Brassicaceae*. Esta espécie hortícola teve origem no do leste Mediterrâneo e é usada como cultura alimentar desde 2000 aC. Produzidas principalmente a partir de sementes, é uma cultura típica das estações outono-inverno e tem o seu melhor desenvolvimento em temperaturas mais amenas (16 °C a 22 °C); contudo, pode ser plantada durante todo o ano por ser uma espécie que apresenta tolerância a mudanças climáticas. A sua difusão por todo o mundo foi efetuada por viajantes e imigrantes (Acikgoz, 2011; Salvino, 2014; Šamec et al., 2018).



Figura 3 - *Brassica oleracea* var. *Acephala*
(Fonte: Šamec et al., 2018).

A nível botânico, é uma planta anual, herbácea, arbustiva e possui caule razoavelmente alto e vertical que emite folhagem nova no topo. De folhas largas, arredondadas com superfície lisa ou ondulada de coloração verde, não forma cabeça densa como a couve-flor e o repolho. É considerada como um repolho sem cabeça, acéfalo, sendo esse motivo a origem do nome var. *Acephala* (Sigrist, 2015).

Comercializada em folhas, esta espécie teve o seu consumo gradativamente aumentado devido aos novos hábitos culinários e às recentes descobertas da ciência no que concerne às suas propriedades nutracêuticas (Cardoso et al., 2017).

A produção mundial de couve e outras brássicas para o consumo humano foi de 70,8 milhões de toneladas em 2020, estando a produção concentrada no continente Asiático como demonstrado na **Figura 4**, destacando-se a China como o maior produtor (33,8 milhões de toneladas), seguido da Índia (9,2 milhões de toneladas) e Rússia (2,6 milhões de toneladas). (FAOSTAT, 2020).

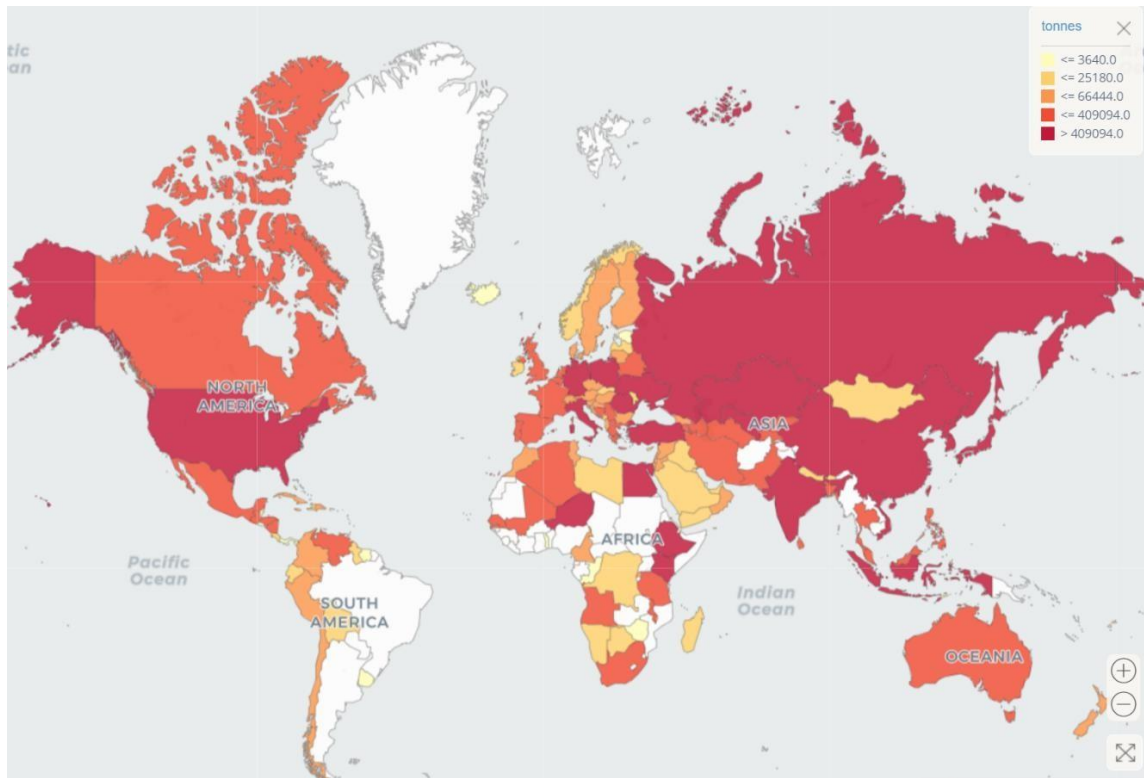


Figura 4 - Figura representativa da produção mundial de couve e outras brássicas em 2020 (Fonte: FAOSTAT, 2020).

1.5.2 Composição nutricional e química

Como demonstrado na **Tabela 4**, a couve galega tem alto teor de Cálcio (210 mg/100g de massa fresca), folato (141 µg/100g de massa fresca), riboflavina (0,130 mg/100g de massa fresca) e vitamina K (704,8 µg/100g de massa fresca). A quantidade de vitamina C (120 mg/100g de massa fresca) destaca-se por ser muito maior na couve do que em outros vegetais como brócolis, couve-flor, repolho e couve de bruxelas (Šamec et al., 2018). Com relação a composição dos ácidos gordos os polissaturados são os mais predominantes com cerca de 0,338 g/100g de massa fresca, estudos indicam que nomeadamente os mais presentes na planta são: C16:3n3, C18:3n3, C18:2n6 (Vidal et al., 2018).

Tabela 4 - Composição nutricional da couve numa porção de 100g (massa fresca).

Componente	Unidade	Couve galega
Energia	kcal	49
Água	g	84,04
Proteínas	g	4,28
Gordura	g	0,93
Açúcar	g	2,26
Hidratos de carbono	g	8,75
Fibras	g	3,6
Vitaminas		
Vitamina A	µg	500
Tiamina	mg	0,110
Riboflavina	mg	0,130
Niacina	mg	1,000
Piridoxina B6	mg	0,271
Vitamina C	mg	120
Vitamina K	µg	704,8
Vitamina E	mg	1,540
Folato	µg	141
Minerais		
Cálcio	mg	210
Magnésio	mg	30
Manganês	mg	0,663
Fósforo	mg	27
Ferro	mg	1,12
Sódio	mg	50
Potássio	mg	251
Cobre	mg	0,055
Zinco	mg	0,27
Selenio	mg	1,5
Ácidos Gordos		
Saturado	g	0,091
Monoinsaturado	g	0,052
Polissaturados	g	0,338

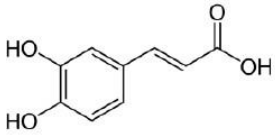
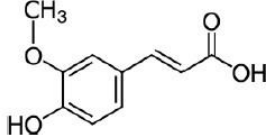
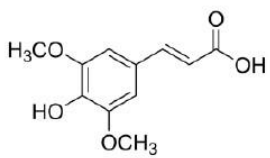
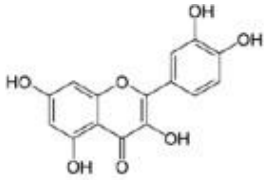
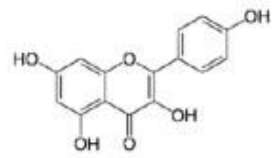
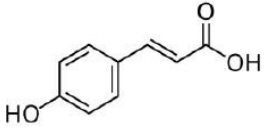
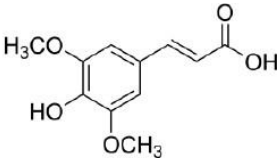
(Fonte: Šamec et al., 2018).

Além de ser uma boa fonte de fibras, vitaminas e minerais, a couve galega apresenta também diferentes compostos bioativos antioxidantes como ácido ascórbico, glucosinolatos, polifenóis, tocoferóis e carotenóides (Fuente et al., 2020).

O grupo de polifenóis mais importante presente nas espécies de *Brassica* são os flavonóides. Estes contêm 15 átomos de carbono em sua estrutura básica dispostos na forma C6-C3-C6 com dois anéis aromáticos ligados por três carbonos que podem ou não se ligar a um terceiro, sendo que um dos importantes fatores para o desenvolvimento da

atividade antioxidante é a presença de um grupo hidroxila livre na posição 3 e/ou 5. Os flavonóis kaempferol e a quercetina, cuja estrutura é apresentada na **Tabela 5**, são a classe mais importante de flavonóides na *Brassica oleracea* (Favela-González et al., 2020; Pereira, 2015; Zardo, 2019).

Tabela 5 - Compostos fenólicos e sua estruturas presentes na couve galega.

Composto	Principais componentes e sua estrutura química	Referências
Ácidos fenólicos	 <p>Ácido cafeico</p>	(Šamec et al., 2018)
	 <p>Ácido ferúlico</p>	
	 <p>Ácido sinapínico</p>	
Flavonóides	 <p>Quercetina</p>	(Šamec et al., 2018)
	 <p>kaempferol</p>	
Ácidos hidroxicinâmicos	 <p>Ácido p-cumárico</p>	(Favela-González et al., 2020)
	 <p>Ácido sinapínico</p>	

Os níveis de macronutrientes, vitaminas, minerais e compostos bioativos dependem de fatores ambientais, condições de cultivo e de crescimento. Estudos mostram que amostras de couve coletadas durante o inverno apresentam maior concentração de alguns minerais como o ferro, zinco, magnésio e cálcio. O estágio de maturação também é um importante fator que influencia na composição do vegetal, foi estudado e demonstrado que o teor de vitamina C é maior em plantas adultas enquanto o de proteína é maior em plantas jovens (Šamec et al., 2018).

1.5.3 Aplicações e benefícios

Sua ampla distribuição mundial e consumo abundante na dieta lhes conferem relevante importância nutricional e econômica (Favela-González et al., 2020).

No que concerne ao uso culinário, as folhas de couve são amplamente utilizadas, podendo ser consumidas cruas, refogadas ou cozidas, em saladas, sopas e sucos desintoxicantes atribuindo benefícios nutricionais aos consumidores (Ministério do Ambiente e da ação climática, 2020).

Além de possuírem propriedades nutricionais que promovem a saúde humana, possuem também elevada atividade antioxidante que desempenham um importante papel na prevenção de doenças associadas ao estresse oxidativo, como doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e cancer (Drabińska et al., 2018).

Na indústria alimentar, os coprodutos da couve também podem ser ricos em bioativos e podem ser utilizados para desenvolver extratos comerciais benéficos para a saúde humana (Thomas et al., 2018). Estes extratos torna-se uma oportunidade interessante para a aplicação de suas atividades biológicas e permite a produção de alimentos sem aditivos sintéticos para os consumidores (Martillanes et al., 2017).

Desta forma, além das propriedades nutricionais e a facilidade de incorporação deste alimento na alimentação diária, é visto novas aplicações a couve galega conjuntamente ao seu potencial bioativo. Neste sentido, esta matriz alimentar traduz-se numa alternativa promissora para a indústria, no que toca à atribuição de um novo destino dos seus biorresíduos e no potencial de aplicação como bioconservante.

2 Objetivos

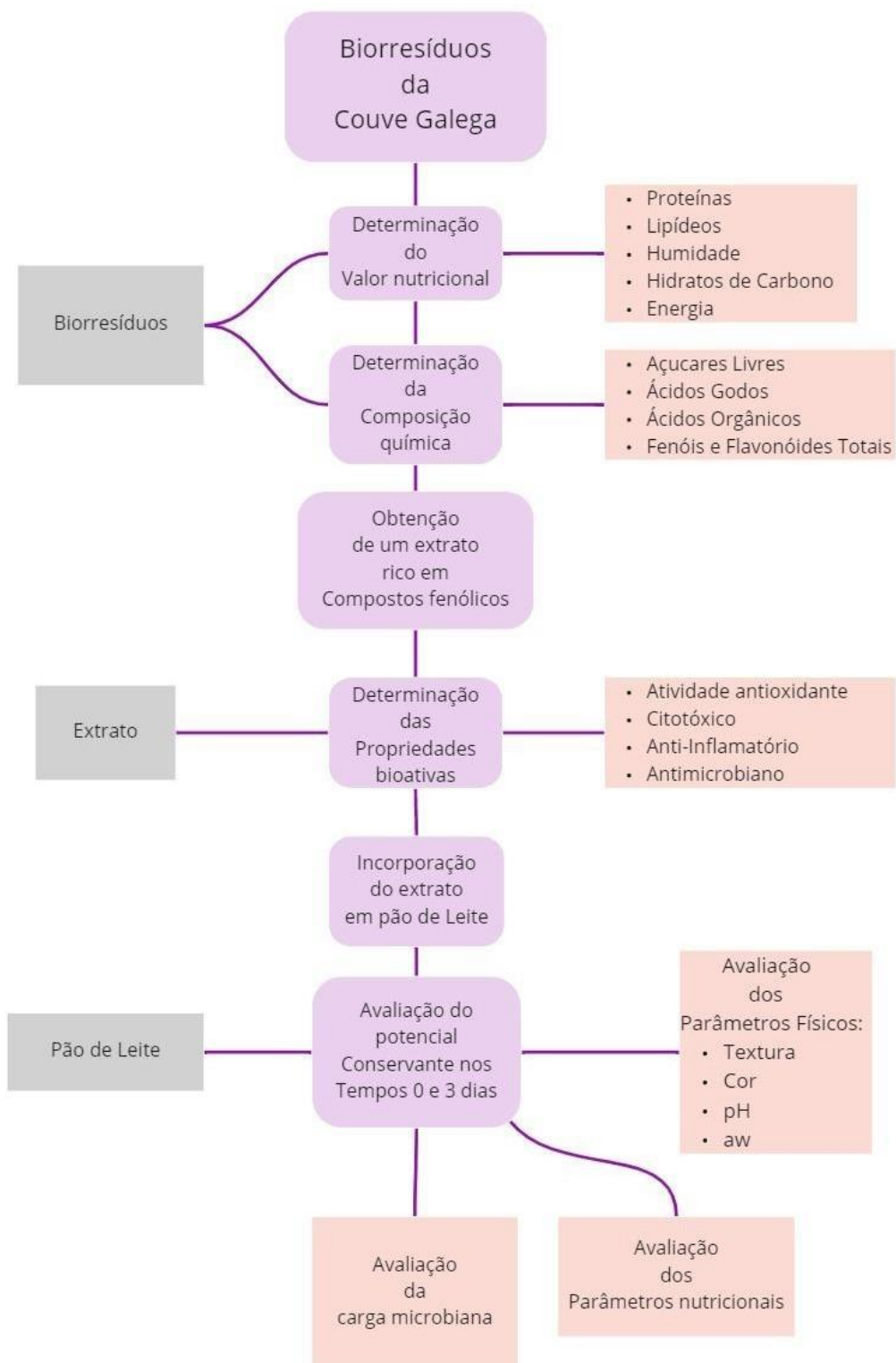
A temática do desperdício alimentar abrange por si só um vasto leque de setores, quer de investigação, social, económico e ambiental, tornando-se um desafio desenvolver estudos nesta área, que sirvam ao mesmo tempo a ciência e a sociedade.

Considerando os valores de desperdício anual no setor alimentar executado por toda a cadeia de valor, é importante identificar os problemas, determinando e instituindo medidas estratégicas para a redução dos mesmos, fazendo o seu reaproveitamento e valorização. Para além disso, tendo em conta que os resíduos produzidos no setor hortofrutícola são variados e a maioria destes apresentam teores consideráveis de compostos bioativos, a sua aplicação na indústria alimentar como possíveis ingredientes conservantes representará uma mais valia na vertente socioeconômica e de saúde.

Este trabalho tem como objetivo a caracterização nutricional, química e bioativa da couve galega, assim como a obtenção de um extrato rico em compostos fenólicos que será incorporado num produto alimentar, a fim de avaliar as propriedades conservantes durante um período de armazenamento definido.

Os objetivos específicos deste trabalho são:

1. Determinação do valor nutricional de couve galega, através da aplicação de metodologias oficiais de análise (AOAC);
2. Determinação da composição química de couve galega, usando técnicas cromatográficas para avaliação do perfil individual em açúcares livres, ácidos gordos e ácidos orgânicos, e técnicas espetofotométricas para a determinação de fenóis e flavonóides totais;
4. Obtenção de um extrato rico em fenóis e flavonóides a partir de couve galega;
3. Determinação das propriedades bioativas do extrato, analisando o potencial antioxidante, citotóxico, anti-inflamatório e antimicrobiano *in vitro*;
5. Incorporação do extrato num produto alimentar, pão de leite, e avaliação das características físicas e nutricionais, assim como avaliação do potencial conservante através da análise da carga microbiana, durante o período de armazenamento de 0 e 3 dias.



micro

Figura 5 - Representação esquemática dos objetivos da dissertação.

3 Material e métodos

3.1 Amostra

Os biorresíduos de couve galega utilizados para esse estudo foram cedidos pela empresa CAMPOTEC e codificados como ALCG. A amostragem era composta por talos, folhas e couves que não cumpriram os requisitos de comercialização. Após a recepção, as amostras frescas foram congeladas e desidratadas (**Figura 6**) através do processo de liofilização (FreeZone 4.5, Labconco, Kansas City, MO, EU.). Por fim foram trituradas e armazenadas para, posteriormente, proceder à realização das análises laboratoriais.



Figura 6 - Biorresíduos de couve galega liofilizado
(Fonte: Ana Luisa Pepinelli, 2022).

3.2 Padrões e reagentes

3.2.1 Análise química e nutricional

Os solventes acetonitrilo (99,9%), n-hexano (95%), etanol absoluto (99,9%) e acetato de etilo (99,8%), todos de grau HPLC, foram adquiridos na empresa Fisher Scientific (Lisboa, Portugal). A mistura padrão com 37 ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME) (C4-C24; norma 47885-U) foi adquirida na empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), assim como os padrões de açúcares (D(-)-frutose, D(+)-sacarose, D(+)-glucose, D(+)-trealose, D(+)-melezitose e D(+)-rafinose pentahidratada), padrões de ácidos orgânicos (L(+)-ácido ascórbico; ácido cítrico; ácido málico; ácido oxálico; ácido succínico; ácido fumárico e ácido quinico). A água foi tratada em um sistema de purificação de água Milli-Q (TGI Pure Water Systems, USA).

3.2.2 Estudo das bioatividades

Atividade citotóxica e toxicidade: Foram adquiridos na empresa Hyclone (Logan, Utah, USA) o soro fetal de bovino (SFB), a L-glutamina, a solução salina de Hank's (HBSS), a solução de penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 mg/mL) e o meio DMEM (meio de cultura para células animais (Dulbecco Modified Eagle)). A Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) forneceu o ácido acético, a elipticina, a sulforodamina B (SRB), o ácido tricloroacético (TCA) e Tris. A água foi tratada como referido anteriormente na **secção 3.2.1**.

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

Atividade antimicrobiana: O Mueller-Hinton agar (MHB) foi obtido na Biolab® (Hungria). O composto p-iodonitrotetrazolium chloride (INT) foi adquirido da Panreac Applichem (Barcelona, Espanha). Os antibióticos imipenem e vancomicina foram obtidos da Hikma farmacêutica (Portugal SA) e a Ampicilina da Janssen farmacêutica (Bélgica).

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

3.3 Determinação do valor nutricional dos bioresíduos de *B. oleracea* var. *Acephala*

A composição nutricional foi realizada através de metodologias oficiais de análise de alimentos (AOAC, 2016), sendo determinado o teor de proteínas, lipídios, cinzas, humidade, hidratos de carbono e energia.

O teor em proteínas (N×6,25) foi obtido pelo método macro-Kjeldahl, como descrito na norma AOAC 978.04 o qual se baseia na quantidade de azoto presente na amostra. Para tal, adiciona-se ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄) à amostra (0,5 g) ocorrendo, desta forma, a digestão da matéria orgânica (**Figura 6**) e consequente formação de um sal inorgânico, o sulfato de amónio (NH₄)₂SO₄, no qual é retido o azoto. De seguida, alcaliniza-se a solução por adição de hidróxido de sódio (NaOH), que

potência a libertação de azoto na forma de amoníaco, NH_3 . O amoníaco é, em seguida, destilado e recolhido numa solução de ácido conhecido, neste caso, H_2SO_4 (0,1 M). Por fim, é feita uma titulação com NaOH (0,1 M) (**Figura 7**), utilizando um indicador vermelho de metilo, que permite quantificar o azoto presente na amostra.



Figura 7 - Equipamentos utilizados para a determinação do teor de proteínas (Fonte: Ana Luisa Pepinelli, 2022).

Os lipídios foram determinados pelo método de extração em Soxhlet (**Figura 8**), como descrito na norma AOAC 920.85 Utilizou-se 3g de amostra, éter de petróleo como solvente de extração e uma temperatura de aproximadamente 80 °C durante 7 horas.



Figura 8 – Equipamento utilizado para a determinação do teor de lipídios (soxhlet) (Fonte: Ana Luisa Pepinelli, 2022).

A obtenção do teor em cinzas foi realizada como descrito na norma AOAC 923.03, onde fez-se uma incineração em mufla a $550 \pm 15^\circ\text{C}$ durante 12 horas (**Figura 9**).



Figura 9 – Amostra após incineração em mufla
(Fonte: Ana Luisa Pepinelli, 2022).

O valor de humidade foi determinado pela diferença entre a massa da amostra antes e após passar pelo processo de liofilização.

Os hidratos de carbono foram calculados por diferença, usando a **Equação 1**. A energia total foi determinada de acordo com a **Equação 2**, sendo que o valor de cada nutriente foi multiplicado por seu equivalente calórico e o somatório expressou a quantidade de calorias na amostra. Os fatores utilizados foram relativos aos hidratos de carbono (4 kcal/g), proteínas (4 kcal/g) e lípidos (9 kcal/g).

$$\text{Hidratos de carbono} = 100 - (g_{\text{proteínas}} + g_{\text{lipídios}} + g_{\text{cinzas}})$$

Equação 1 - Equação para determinação de hidratos de carbono.

$$\text{Energia(Kcal)} = 4 \times (g_{\text{proteínas}} + g_{\text{hidratos de carbono}}) + (9 \times g_{\text{gordura}})$$

Equação 2 - Equação para determinação da energia total.

3.4 Determinação da composição química dos bioresíduos de *B. oleracea* var. *Acephala*

3.4.1 Açúcares

Os açúcares livres foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de índice de refração (HPLC-RI), conforme descrito por Barros et al. (2013).

À amostra (1 g) foi adicionada melezitose (utilizada como padrão interno, 25 mg/mL) e 40 mL de etanol (80:20, v/v), num banho a 70 °C (Julabo, SW22; Seelbach, Alemanha), durante 1 hora e 30 min, com agitação a cada 15 minutos.

Posteriormente, o sobrenadante obtido foi centrifugado (centrífuga refrigerada K24OR, Centurion, Sussex Ocidental, Reino Unido) a 350 rpm durante 10 minutos e transferido para um balão de vidro para evaporar a fração etanólica com auxílio de um evaporador rotativo (Büchi R-210, Flawil, Suíça) (60 °C, pressão reduzida). A fase aquosa foi lavada 3 vezes com éter dietílico (10 mL), as duas fases aparentes foram separadas e a primeira foi vertida para um tubo (Figura 10), sendo, seguidamente, os restos do éter dietílico presente no tubo evaporados em estufa. Ao resíduo seco obtido, foi adicionada água até perfazer um volume final de 5 mL e filtrou-se 1,5 mL do mesmo (filtros de nylon - 0,2 µm, Whatman) para um vial, a fim de proceder à análise do perfil em açúcares no sistema HPLC.



Figura 10 - Procedimento experimental para determinação dos Açúcares – Duas fases aparentes após lavagem com éter dietílico (A), Tubo contendo a primeira fase após separação (B)
(Fonte: Ana Luisa Pepinelli, 2022).

O sistema de HPLC encontra-se equipado com uma bomba (Knauer, Sistema Smartline 1000, Berlim, Alemanha), um sistema desgaseificador (Smartline manager 5000), um amostrador automático (AS-2057 Jasco, Easton, Maryland, EUA) e um detector de índice de refração (Knauer Smartline 2300). A separação cromatográfica foi

obtida através de uma coluna Eurospher 100-5 NH₂ (4,6 x 250 mm, 5 µm, Knauer), que operou a uma temperatura de 35 °C (7971 R Grace).

Como fase móvel foi usado acetonitrilo/água desionizada (70:30; v/v) com um caudal de 1 mL/min, sendo o volume de injeção de 10 µL. Para a identificação dos compostos, recorreu-se ao software Clarity 2,4 Software (DataApex), com o qual se compararam os tempos de retenção relativos dos picos da amostra, com padrões conhecidos. Os resultados foram obtidos pelo método do padrão interno e expressos em grama de composto por 100 g de massa fresca.

3.4.2 Ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos foram determinados através de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de díodos (UFLC-DAD), como descrito anteriormente por Barros et al. (2013b).

A extração foi realizada ao abrigo da luz adicionando 25 mL de ácido metafosfórico (4,5%) à amostra (1,5 g), colocando-a sob agitação magnética durante 20 min à temperatura ambiente. Após extração, a mistura foi filtrada através de papel de filtro (Whatman N^o 4) para um tubo de ensaio de 20 mL e, posteriormente, através de filtros de nylon (0,2 µm; Whatman) para um vial âmbar (1,5 mL) para proceder com a análise em UFLC (Shimadzu Corporation, Quioto, Japão). A separação dos mesmos foi obtida através de uma coluna SphereClone (Phenomenex, Torrance, California, EUA) de fase inversa C18 (5 µm, 250 mm x 4,6 mm i.d.) termostaticada a 35 °C, sendo a eluição realizada com ácido sulfúrico (3,6 mM) com um caudal de 0,8 mL/min, sendo o volume de injeção de 20 µL.

A detecção dos ácidos orgânicos foi obtida recorrendo a um sistema DAD, aplicando os comprimentos de onda de 215 nm e 245 nm (para o ácido ascórbico). A quantificação dos compostos foi efetuada por comparação da área dos seus picos registados, nos comprimentos de onda referidos anteriormente, com as curvas de calibração obtidas a partir dos padrões do respetivo composto. Os resultados foram expressos em mg de composto por 100 g de massa fresca.

3.4.3 Ácidos gordos

Os ácidos gordos foram determinados por cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama (GC-FID), como descrito anteriormente por (Pereira et al., 2012).

Ao extrato lipídico obtido previamente por extração em Soxhlet, foram adicionados 5 mL de uma solução de metanol/ácido sulfúrico/tolueno, na proporção 2:1:1 (v/v/v) e a mistura permaneceu num banho (Julabo, SW22; Seelbach, Alemanha) a 50 °C (com agitação de 160 rpm) durante aproximadamente 12 h. Após retirar os tubos do banho e, com o intuito de potenciar a separação de fases, foi adicionada água desionizada (3 mL) na mistura e, posteriormente, para recuperação dos ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME) adicionou-se éter dietílico (3 mL), ambos os passos com agitação em vórtex. Após separação das fases, transferiu-se o sobrenadante para um vial, no qual se adicionou previamente sulfato de sódio anidro, a fim de desidratar o sobrenadante. Por último, filtrou-se o mesmo através de filtros de nylon (0,2 µm; Whatman; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) para um vial (**Figura 11**), para posterior análise em GC.



Figura 11 – Amostra após filtragem
(Fonte: Ana Luisa Pepinelli, 2022).

O perfil de ácidos gordos foi obtido através de um sistema de GC (Modelo DANI GC 1000) equipado com um injetor split/splitless, um detector de ionização de chama (FID, 260 °C) e uma coluna Zebron-Kame (20 m x 0,18 mm ID x 0,15 µm df; Phenomenex, Lisboa, Portugal). O programa de temperatura aplicado foi o seguinte: temperatura inicial de 80 °C, durante 1,5 min; aumento progressivo da temperatura: 40 °C/min até 160 °C; 5 °C/min até 185 °C; 30 °C/min até 260 °C que permaneceu durante 4 min. O gás de transporte utilizado foi o hidrogénio com um caudal de 0,6 mL/min, medido a 250 °C. A injeção split (1:80) foi realizada a 260 °C, onde foi injetado 1 µL da amostra.

A identificação de ácidos gordos foi feita com base nos tempos de retenção relativos dos picos de FAME das amostras com padrões conhecidos. Para o processamento dos resultados, recorreu-se ao software Clarity DataApex 4.0 (Praga, República Checa) e estes foram expressos em percentagem relativa (%) para cada ácido gordo detectado.

3.4.4 Fenois e Flavonóides totais

A determinação do teor de compostos fenólicos totais foi feita no extrato hidroetanólico obtido a partir dos biorresíduos de couve galega, através de um método espectrofotométrico, utilizando o reagente Folin–Ciocalteu (Wolfe et al., 2003). Ao extrato (500 µl) foram adicionados 2,5 ml de reagente de Folin-Ciocalteu (1:10, v/v; em água) e 2 ml de carbonato de sódio (75 g/L). A mistura foi homogeneizada no vortex durante 15 seg e colocados no banho-maria durante 30 min a 40 ° C, para o desenvolvimento de cor (**Figura 12**). Em simultâneo, foi preparado um branco contendo apenas solvente. Seguidamente, foi medida a absorvância a 765 nm (**Figura 12**) num espectrofotómetro e calculada a concentração utilizando uma curva padrão obtida com ácido gálico. Os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico por grama de extrato (mg GAE/ g extrato).

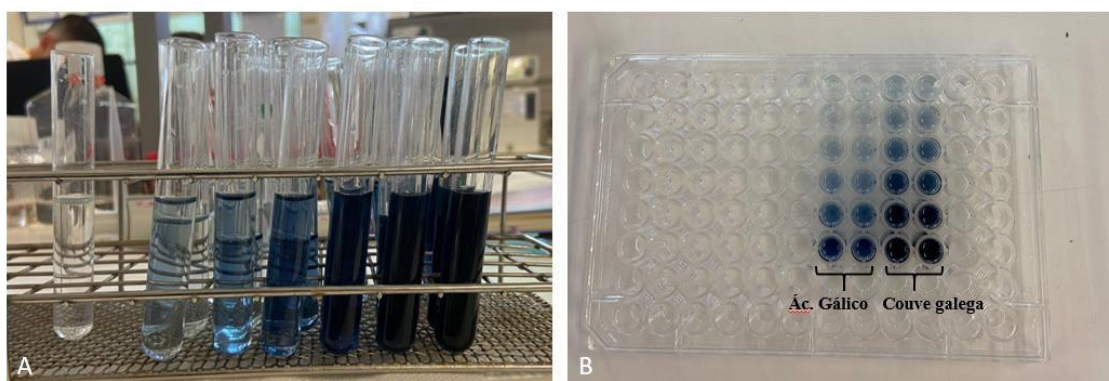


Figura 12 – Análise de fenóis totais – Intensidade da cor do extrato de couve galega (A) e microplaca contendo a reta de calibração (Ác. Gálico) e extrato de couve galega (B)
(Fonte: Ana Luisa Pepinelli, 2022)

A determinação de flavonóides totais foi, também, determinada no extrato hidroetanólico obtido a partir do bioresíduos de couve galega. Para tal, foi aplicado um método espectrofotométrico, tendo-se utilizado uma solução padrão de catequina para obtenção da curva de calibração (Zhishen et al., 1999). Prepararam-se diferentes

concentrações (1:2) dos extratos das amostras por diluição sucessiva (**Figura 13**). Aos 500 μl da solução de extrato ou padrão foram adicionados 2 ml de água destilada e, posteriormente, 150 μl da solução de NaNO_2 (5%). A mistura foi homogeneizada no vortex durante 15 seg e deixados em repouso durante 6 min; após adição de 150 μl de solução de AlCl_3 (10%), os tubos foram novamente levados ao vortex durante 15 seg e, mais uma vez, deixados em repouso durante 6 minutos. Misturou-se 2 ml da solução de NaOH (4%), 200 μl de água destilada, agitou-se em vortex durante 15 seg e deixou-se repousar durante mais 15 min. Por último, mediu-se a absorvância a 510 nm e calculou-se a concentração de flavonóides totais utilizando uma curva padrão obtida com catequina, sendo os valores expressos em mg de catequina por g de extrato (mg CE/ g extrato).

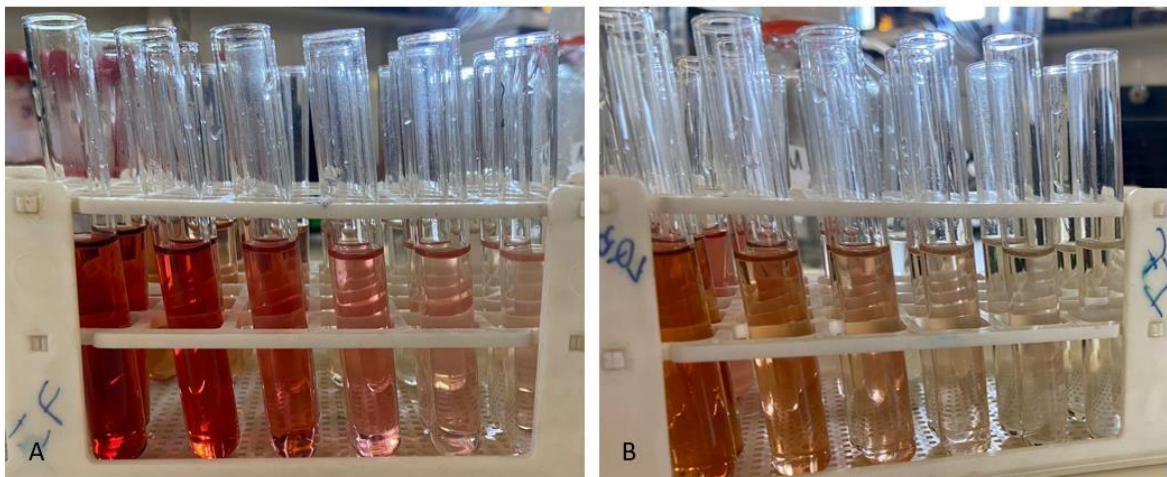


Figura 13 - Análise de flavonóides – Intensidade da cor na solução padrão de catequina (A) e intensidade da cor do extrato de couve galega (B)
(Fonte: Ana Luisa Pepinelli, 2022).

3.5 Avaliação das propriedades bioativas do extrato hidroetanólico obtido a partir dos bioresíduos de *B. oleracea* var. *Acephala*

O potencial bioativo do extrato hidroetanólico obtido a partir dos bioresíduos de *B. oleracea* var. *Acephala* foi avaliado através da determinação das propriedades antimicrobianas, citotóxicas e hepatóxica, anti-inflamatórias e antioxidantes. O extrato hidroetanólico foi obtido e preparado para cada uma das análises conforme descrito na próxima secção (**secção 3.5.1**).

3.5.1 Extração da amostra por maceração

Foi preparado um extrato a partir do material vegetal seco por liofilização. A amostra liofilizada (bioresíduos de *B. oleracea* var. *Acephala*) (1 g) foi submetida a maceração com uma solução de etanol/água (80:20, v/v; 30 mL) à temperatura ambiente, com agitação constante (150 rpm) durante 1 hora. Posteriormente, foi filtrada através de um papel de filtro (Whatman No. 4; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e o processo foi repetido, sendo a amostra re-extraída com 30 mL da mesma solução hidroetanólica. Por fim, a fração alcoólica dos extratos obtidos foi evaporada a pressão reduzida (Büchi R-210, Flawil, Suíça) e a fração aquosa foi liofilizada (47 °C, 0.045 bar; FreeZone 4.5, Labconco, Kansas City, MO, EUA) para a realização das análises do potencial bioativo. Uma quantidade do extrato seco obtido (10 mg) foi, posteriormente, re-dissolvido numa solução de EtOH/H₂O (20:80, v/v; 2 mL) e seguidamente, filtrado através de discos LC descartáveis de 0,22- μ m para posterior análise em HPLC.

O extrato hidroetanólico obtido foi dissolvido, separadamente, em: meio decultura (10 mg/mL) para os ensaios de atividade antimicrobiana (**secção 3.5.2**); água destilada com concentração de 8 mg/mL para a avaliação da atividade citotóxica, tóxica (**secção 3.5.3**) e atividade anti-inflamatória (**secção 3.5.4**); e em solução hidroetanólica (EtOH/H₂O; 80:20 (v/v)) com concentração de 5 mg/mL para a avaliação da atividade antioxidante (**secção 3.5.5**). Posteriormente, estas soluções foram diluídas sucessivamente de forma a obter as concentrações de trabalho.

3.5.2 Atividade antimicrobiana

3.5.2.1 Atividade antibacteriana

Para avaliação da atividade antibacteriana seguiu-se a metodologia descrita por Carochi et al. (2015) e foram utilizadas bactérias Gram-negativas e Gram-positivos. As Gram-negativas foram: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella* Typhimurium (ATCC 13311) e *Enterobacter cloacae* (ATCC 35030). As Gram-positivas foram: *Staphylococcus aureus* (ATCC 11632), *Bacillus cereus* (isolado clínico), *Listeria monocytogenes* (NCTC 7973). Estes microrganismos foram adquiridos no Laboratório de Micologia do Departamento de Fisiologia Vegetal do Instituto de Investigação Biológica “Siniša Stanković” da Universidade de Belgrado na Sérvia. Com a aplicação do método

de microdiluição foi possível a determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e a concentração mínima bactericida (CMB) para o extrato avaliado.

As culturas de bactérias foram ajustadas através do espectrofotometro ficando com uma concentração de 1×10^5 UFC/mL, correspondendo a uma suspensão bacteriana determinada num espectrofotômetro a 625 nm. As diluições de inóculos foram cultivadas em meio sólido para verificar a ausência de contaminação e verificar a validade do inóculo. As diferentes diluições do extrato hidroetanólico de *B. oleracea* var. *Acephala* foram pipetadas para os poços contendo 100 μ L de caldo de soja tríptico (TSB) e, posteriormente, foram adicionados 10 μ L de inóculo. As microplacas foram incubadas por 24 horas a 37 °C.

Para a determinação da concentração mínima inibitória (CMI, menor concentração que produziu uma inibição significativa de 50% do crescimento da bactéria em comparação com o controlo positivo) foram adicionados 40 μ L de cloreto de iodonitrotetrazólio (INT) (0,2 mg/mL) e incubou-se a 37 °C durante 30 min. As CMIs obtidas do teste de suscetibilidade de várias bactérias ao extrato foram determinadas também por um ensaio colorimétrico de viabilidade microbiana baseado na redução da cor INT e comparado com um controlo positivo para cada estirpe bacteriana. A CMB (concentração mínima bactericida) foi determinada por subcultura em série, colocando 10 μ L de cada poço que não apresentou mudança de cor a 100 μ L de TSB. A menor concentração que não apresentou crescimento após essa subcultura foi considerada como a CMB. A ampicilina foi usada como controlo positivo. Os resultados de CMI e CMB foram expressos em mg/mL de extrato hidroetanólico liofilizado.

3.5.2.2 Atividade antifúngica

Para a avaliação da atividade antifúngica, foi seguido um procedimento descrito por Carochi et al. (2015). Para tal, foram utilizados seis microfungos, sendo eles: *Aspergillus fumigatus* (isolado clínico), *Aspergillus niger* (ATCC 6275), *Aspergillus versicolor* (ATCC 11730), *Penicillium funiculosum* (ATCC 36839), *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium* (isolado alimentar) e *Trichoderma viride* (IAM 5061). Estes organismos foram adquiridos no Laboratório de Micologia do Departamento de Fisiologia Vegetal do Instituto de Investigação Biológica “Siniša Stanković” na Universidade de Belgrado na Sérvia.

Os micromicetos foram mantidos em malte ágar (MA) e as culturas foram armazenadas a 4 °C e sub-cultivadas uma vez por mês. Os esporos fúngicos foram lavados da superfície das placas de ágar com solução salina estéril a 0,85 % contendo Tween 80 a 0,1 % (v/v). A suspensão de esporos foi ajustada com uma solução salina estéril para uma concentração de aproximadamente $1,0 \times 10^5$ num volume final de 100 µL por poço. Os inóculos foram armazenados a 4 °C. As diluições dos inóculos foram cultivadas em MA sólido para verificar a ausência de contaminação e a validade do inóculo. A determinação da CMI foi realizada pela técnica de diluição sucessiva em microplacas de 96 poços. A amostra foi adicionada ao meio de malte com o inóculo fúngico e as microplacas foram incubadas durante 72 horas a 28 °C. As concentrações mais baixas sem crescimento visível (usando um microscópio binocular) foram definidas como CMI. As concentrações mínimas fungicidas (CMFs) foram determinadas por subcultura em série de 2 µL de cada poço que não apresentou atividade, em microplacas contendo 100 µL de caldo de malte por poço e posterior incubadas durante 72 horas a 28 °C. A menor concentração sem crescimento visível foi definida como CMF, indicando 99,5% de morte do inóculo original. O DMSO a 5% foi utilizado como controlo negativo, enquanto o cetoconazol foi utilizado como controlo positivo. Os resultados de CMI e CMF foram expressos em mg/mL de extrato hidroetanólicos.

3.5.3 Avaliação da citotoxicidade e toxicidade

Para a avaliação do potencial citotóxico do extrato hidroetanólico (80:20; v/v) obtido a partir dos resíduos de *B. oleracea* var. *Acephala*, foi procedido o ensaio de Sulforodamina B (SRB) como descrito por Barros et al. (2013).

Para testar a capacidade antiproliferativa do extrato em células tumorais, foram usadas linhas celulares tumorais humanas, tais como: AGS (adenocarcinoma gástrico), CaCo (adenocarcinoma colorretal), MCF-7 (carcinoma da mama) e NCI-H460 (carcinoma de pulmão). Uma linha celular não tumoral também foi testada, sendo ela: VERO (obtida a partir de rim de macaco verde Africano). Todas as linhas foram obtidas no DMSMZ – Leibniz – Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. As linhas tumorais foram mantidas como culturas aderentes em meio RPMI-1640 suplementado com 10 % de soro bovino fetal (FBS), glutamina (2 mM), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL); e a linha não tumoral foi mantida

em meio DNEM suplementado com 10 % de soro bovino fetal (FBS), glutamina (2 mM), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL). As culturas (tumoriais e não tumoral) foram incubados a 37 °C numa incubadora com ar umidificado e 5% CO₂.

Todos os procedimentos foram realizados em ambiente asséptico e em câmara de fluxo laminar (TLStar, AV-30/70), a fim de evitar contaminações. Foram testadas concentrações de 0,125 a 8 mg/mL, através da diluição em água. Cada uma das concentrações do extrato (10 µL) foram incubadas, com a suspensão celular (190 µL) das linhas celulares testadas, em microplacas de 96 poços por 72 horas. As microplacas foram incubadas a 37 °C numa incubadora com ar umidificado e 5% CO₂. Cada linha celular foi testada numa densidade apropriada, sendo as tumorais em $1,0 \times 10^4$ células/poço e a não tumoral em $1,9 \times 10^4$ células/poço. Após tal período de incubação, adicionou-se a cada poço ácido tricloroacético frio (TCA, 10% w/v; 100 µL), incubando-se de seguida durante 60 min a 4 °C. As microplacas foram lavadas com água desionizada e secas. Em seguida, adicionou-se solução de SRB (0,057 %, m/v; 100 µL), ficando a placa a incubar durante 30 min à temperatura ambiente. Posteriormente, lavou-se a placa com ácido acético (1% v/v) para remover o excesso de SRB e deixou-se secar ao ar.

A SRB foi solubilizada com 200 µL de Tris (10 mM; pH 7,4) num agitador de microplacas (Stat Fax-2100). A absorbância foi medida em um comprimento de onda de 540 nm num leitor de microplacas (Instrumentos Bio-Tek, ELX800, Inc; Winooski, EUA), utilizando-se a elipticina como controlo positivo. Os resultados foram expressos em valores de GI₅₀ (concentração de amostra que inibe 50% de crescimento celular) em unidades de µg/mL.

3.5.4 Avaliação da atividade anti-inflamatória

A avaliação da atividade anti-inflamatória foi feita de acordo com o procedimento de Jabeur et al. (2016). Foram usadas células macrófagas RAW 264.7 de rato obtidas no DMSMZ - Leibniz - Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH.

O extrato hidroetanólico obtido a partir de bioresíduos de *B. oleracea* var. Acephala foi dissolvido em água a fim de obter a concentração final de 8 mg/mL. A partir desta concentração foram feitas diluições sucessivas com intuito de obter as concentrações de teste (0,125 - 8 mg/mL). Foram feitas culturas de células macrófagas

RAW 264.7 de rato em meio DMEM, suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS) inativado por calor, glutamina e antibióticos. Essas culturas foram incubadas a 37 °C com 5% de CO₂ em ar umidificado.

As células com crescimento ativo foram soltas com um raspador, a densidade experimental das células foi estabelecida a 5×10^5 células/mL e a proporção de células mortas foi inferior a 5%, de acordo com o teste de exclusão de azul tripano. Seguidamente, as células (300 µL) foram distribuídas numa placa de 96 poços (150 000 células/poço) e a microplaca foi incubada por 24 horas na incubadora nas condições previamente indicadas para permitir adequada aderência e multiplicação das células. Depois deste período, as células foram tratadas com diferentes concentrações dos extratos de couve (15 µL; 0,125 - 8 mg/mL) e incubadas durante 1 hora com a faixa de concentração testada de 6,25 - 400 µg/mL. Posteriormente, foi realizada uma estimulação com adição de 30 µL de lipopolisacáridos (LPS) (1 mL/mL) e incubado novamente pelo período de 1 hora.

Dexametasona (50 mM) foi usada como controlo positivo e amostras sem adição de LPS foram usada como controlo negativo com o intuito de observar se estes induziam alterações nos níveis basais de óxido nítrico (NO).

A quantificação de óxido nítrico foi determinada utilizando um Kit de Reagentes Griess (soluções de nitrofenamida, etilenodiamina e nitrito) e através da curva de calibração do nitrito (100 mM nitrito de sódio a 1,6 mM) preparada em placa de 96 poços. O óxido nítrico produzido foi determinado medindo a absorbância a 540 nm (leitor de microplacas ELX800 Biotek) e comparado com a curva de calibração (Jabeur et al., 2016). Os resultados foram calculados através da representação gráfica do percentual de inibição da produção de óxido nítrico versus a concentração da amostra, e foram expressos em valores de IC₅₀ (concentração de amostra que inibe 50% da produção de óxido nítrico).

3.5.5 Avaliação da atividade antioxidante

3.5.5.1 TBARS

A análise procedeu-se conforme descrito por Barros et al. (2010). Cérebros de porco, obtidos num matadouro local, foram dissecados e homogeneizados com um Polytron em tampão Tris-HCl gelado (20 mM, pH 7,4), para produzir um homogenato de

tecido cerebral 1:2 (*p/v*) que foi centrifugado a 3500 *rpm* por 10 min. Uma alíquota (0,1 mL) do sobrenadante foi incubada com as diferentes concentrações do extrato hidroetanólico de *B. oleracea* var. *Acephala* (0,2 mL; 5 - 0,019 mg/mL) na presença de sulfato de ferro FeSO₄ (10 µM; 0,1 mL) e ácido ascórbico (0,1 mM; 0,1 mL) a 37 °C por 1 h. Após a incubação, a reação foi interrompida pela adição de ácido tricloroacético (28% *p/v*, 0,5 mL), seguido por ácido tiobarbitúrico (TBA, 2%, *p/v*, 0,38 mL), e a mistura foi então aquecida a 80 °C por 20 minutos. Após centrifugação a 3000 *rpm* durante 5 minutos para remover a proteína precipitada, a intensidade da cor do complexo MDA-TBA (**Figura 14**) no sobrenadante foi medido pela sua absorvância a 532 nm. A taxa de inibição (%) foi calculada usando a **Equação 3** onde A representa a absorvância do controlo e B a absorvância da solução do composto.

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

Equação 3 - Equação da determinação da taxa de inibição em ensaio TBARS.

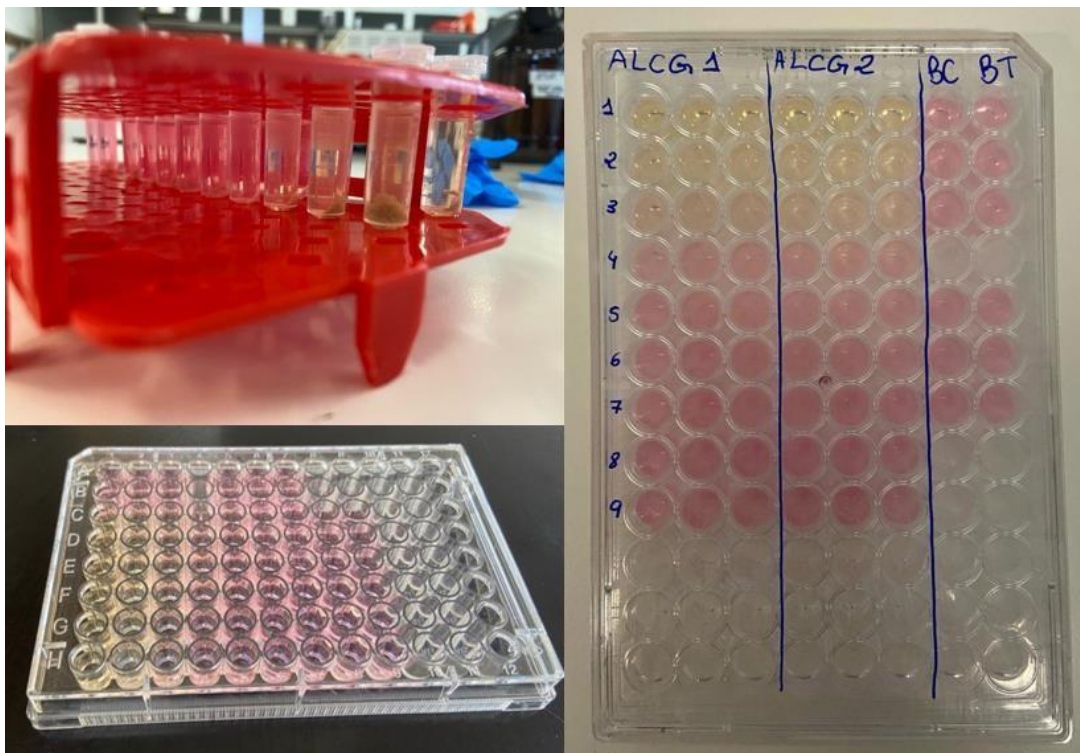


Figura 14 - Ensaio de avaliação da atividade antioxidante TBARS
(Fonte: Ana Luisa Pepinelli, 2022).

3.5.5.2 Avaliação da atividade antioxidante celular (CAA)

Para avaliar a atividade antioxidante celular (CAA), o extrato hidroetanólico de *B. oleracea* var. *Acephala* foi dissolvido em água para obter uma concentração de 8 mg/mL, a partir da qual foram feitas diluições sucessivas usando 2,7-diclorodihidrofluoresceína (DCFH) preparadas com etanol e diluída com HBSS (50 µM) com o intuito de obter as concentrações a serem testadas (500 - 2000 µM).

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

Os macrófagos foram separados com um raspador de células e o conteúdo foi transferido para um falcon. A solução foi centrifugada por 5 minutos a 1200 rpm. O meio foi descartado e uma nova quantidade de meio foi adicionado baseado na quantidade de precipitado obtido após centrifugação. Uma solução com densidade celular de 70 000 células/mL foi então preparada e transferida (300 µL) para microplacas pretas com fundo transparente (SPL Lifesciences) e incubadas por 48h. Após o período de incubação, o meio foi descartado e as células foram lavadas com HBSS (2x, 100 µL), tratadas com diferentes concentrações do extrato (200 µL; 32,5 - 2000 µM) e incubadas por 1 hora. Depois, as células foram lavadas novamente com HBSS (2x, 100 µL) e uma solução de 2,2 2'-azobis (2- metilpropionamida) dicloridrato (AAPH) (100 µL; 600 µM) foi adicionada. A fluorescência foi lida a cada 5 minutos durante 1 hora (leitor de microplacas Biotek FLx800) a 485 nm de excitação e 538 nm de emissão. A quercetina foi usada como controlo positivo e diclorodihidrofluoresceína e meio de cultura DMEM foram usados como controlo negativo.

3.5.6 Incorporação do extrato rico em compostos fenólicos num produto de padaria

Para a incorporação de um ingrediente natural com potencial conservante foi utilizado o extrato hidroetanólico obtido a partir dos bioresíduos de *B. oleracea* var. *Acephala*, que para além de ter uma concentração muito satisfatória de fenóis e

flavonóides totais, também possui interesse quanto ao reaproveitamento dos seus biorresíduos industriais.

A incorporação foi realizada em pães de leite, um produto alimentar amplamente comercializado, apreciado e consumido nos países industrializados.

O potencial conservante do ingrediente natural (extrato rico em fenóis e flavonóides, obtido a partir dos bioresíduos de couve galega) foi testado nos tempos 0 e 3 dias de armazenamento.

A fim de determinar possíveis alterações, causadas pela adição do ingrediente natural, no produto alimentar funcionalizado foram realizados ensaios físicos (textura, pH, cor, atividade da água) e nutricionais (teor em lipídios, cinzas, proteínas, hidratos de carbono, humidade e energia), respetivamente. O potencial conservante foi avaliado pela determinação da carga microbiana ao longo do tempo. As amostras com a adição do ingrediente natural foram comparadas com amostras controlo (sem adição de qualquer tipo de aditivos) e com amostras onde se fez a incorporação do aditivo sintético habitualmente aplicado industrialmente neste produto alimentar (ácido sórbico - E200).

3.5.7 Preparação do produto de pastelaria – Pão de leite

Com intuito de proceder à incorporação do extrato rico em fenóis e flavonóides, foi preparado pão de leite, por ser um produto de pastelaria muito consumido e acessível à maioria da população. Desta forma, foi preparada uma receita de pão de leite disponível na literatura (em triplicado), sendo uma delas sem adição de qualquer tipo de aditivo, outra com adição do ingrediente natural e outra com adição do ácido sórbico (o conservante conhecido como E200, amplamente utilizado pela indústria alimentar na produção de pães de leite).

A quantidade de ingrediente natural, assim como a quantidade do ácido sórbico foi definida baseada de acordo com o regulamento Europeu (EC N° 98/2018, 2018) que limita o seu uso a 2 000 ppm (0,2 %), onde a quantidade adicionada em gramas é determinada usando como referência a quantidade de farinha (100 %).

A receita comporta os seguintes ingredientes:

- 125 mL de leite
- 0,7 g do extrato natural/ácido sórbico
- 1 ovo

- 20 g de açúcar
- 5 g de sal
- 2,5 g de fermento biológico
- 20 mL de óleo
- 7 g de manteiga
- 350 g de farinha de trigo

Para a preparação dos pães, o ingrediente natural e o aditivo conservante sintético foram dissolvidos no leite e misturados com os demais ingredientes (com exceção da farinha de trigo). Posteriormente, a farinha foi adicionada e a massa foi amassada com as mãos. Após essa etapa, a massa foi fracionada em porções de 60 g e deixada crescer em temperatura ambiente durante 1 hora. Por fim, os pães foram levados ao forno a 180 °C durante 40 minutos.

Os pães foram armazenados durante 3 dias (considerando o tempo de vida útil de uma preparação caseira) (**Figura 15 e 16**) embalados individualmente em sacos transparentes (**Figura 17**) e acondicionados em local seco e fresco. Posteriormente, foram realizadas avaliações físicas, nutricionais, e de determinação da carga microbiana, para testar a viabilidade dos aditivos adicionados.

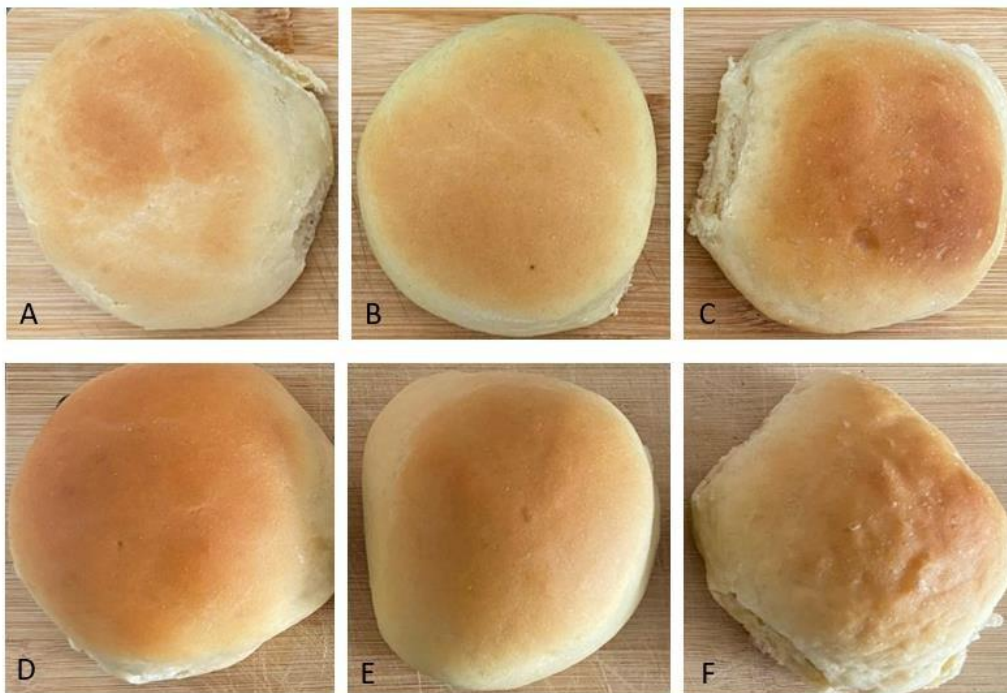


Figura 15 - Produto final – pão de leite inteiro. Amostra controlo T = 0 dias (A) T= 3 dias (D), amostra com adição de extrato natural T = 0 dias (B) T= 3 dias (E); amostra com adição de ácido sórbico T = 0 dias (C) T= 3 dias (F) (Fonte: Ana Luisa Pepinelli, 2022).

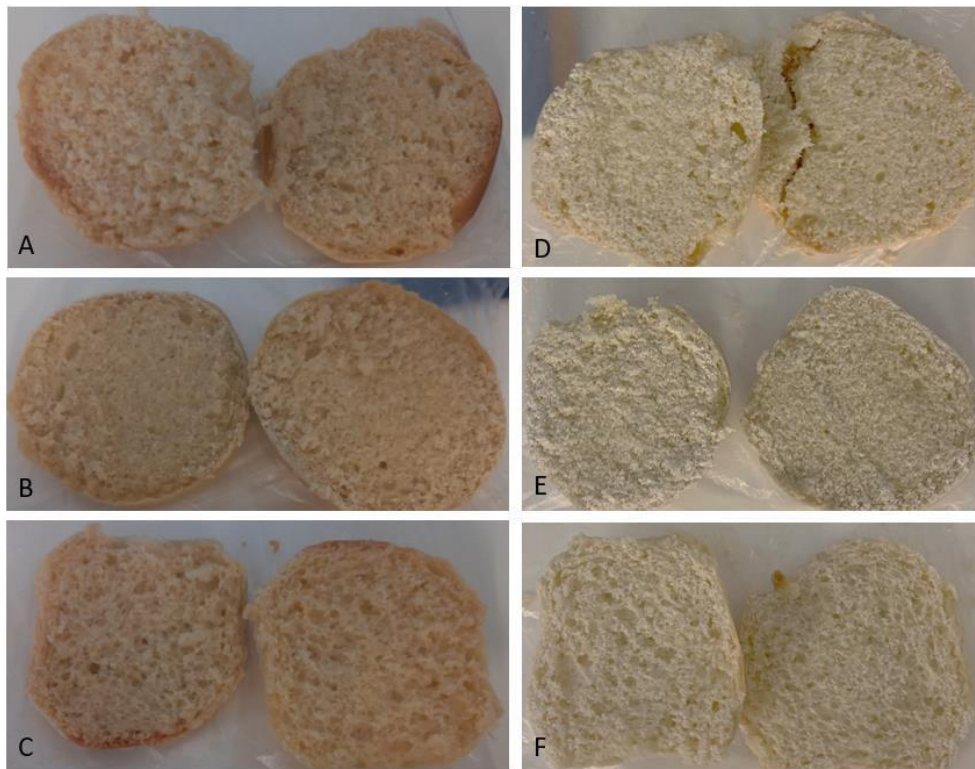


Figura 16 - Produto final – pão de leite cortado. Amostra controlo T = 0 dias (A) T= 3 dias (D), amostra com adição de extrato natural T = 0 dias (B) T= 3 dias (E); amostra com adição de ácido sórbico T = 0 dias (C) T= 3 dias (F) (Fonte: Ana Luisa Pepinelli, 2022).



Figura 17 - Pães embalados individualmente em sacos transparentes (Fonte: Ana Luisa Pepinelli, 2022).

3.5.8 Avaliação dos parâmetros físicos dos pães de leite

Cor. A medição de cor foi feita com o intuito de avaliar as possíveis diferenças após incorporação do ingrediente natural e do conservante alimentar (**Figura 15 e 16**). Para a medição deste parâmetro nas amostras foi utilizado um colorímetro (modelo CR-400; Konica Minolta Sensing, Inc., Tóquio, Japão) acoplado a um adaptador para materiais granulosos (modelo CRA50) (**Figura 18**), seguindo a metodologia previamente descrita por Roriz et al. (2017).



Figura 18 – Equipamento utilizado para medição da cor nas amostras de pão de leite (Fonte: Ana Luisa Pepinelli, 2022).

Os valores das coordenadas tridimensionais CIE L^* a^* b^* , foram obtidos num sistema computadorizado com um iluminante tipo C e um diafragma de diâmetro 8 mm, sendo que para o processamento dos dados, recorreu-se ao software Spectra Magic Nx (versão CM-S100W 2.03.0006, Konica Minolta, Japão). Relativamente às coordenadas tridimensionais obtidas, L^* representa a luminosidade, a^* representa a cromaticidade num eixo do verde (-) a vermelho (+), e b^* representa a cromaticidade num eixo do azul (-) ao amarelo (+), como ilustrado na **Figura 19**.

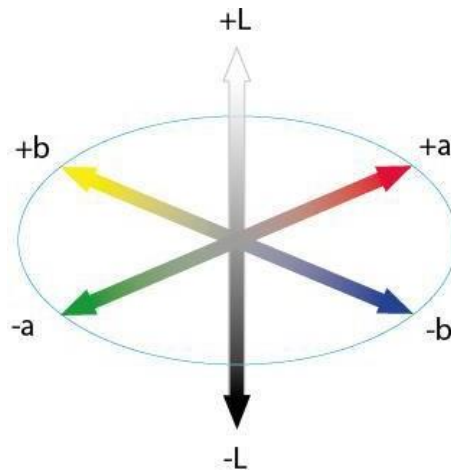


Figura 19 - Modelo das coordenadas tridimensionais da cor
(Fonte: Sánchez-Mata & Tardío, 2016).

Para a avaliação da cor nos pães, foram feitas 3 leituras em 3 pontos distintos para cada porção, considerando-se os valores médios. Antes e depois da análise, o instrumento utilizado foi calibrado com um padrão branco (Spectra Magic NX Instruction Manual, Konica Minolta Sensing, Inc., 2009, Japão). As leituras foram realizadas nos dois tempos de armazenamento ($t = 0$ e $t = 3$ dias).

A diferença de cor total (ΔE) entre os tempos 0 e 3 dias foi calculada conforme a **Equação 4**, apresentada abaixo:

$$\Delta E = \sqrt{(L1 - L2)^2 + (a1 - a2)^2 + (b1 - b2)^2}$$

Equação 4 - Diferença total de cor entre os tempos 0 e 3 dias.

pH. A medição do pH foi feita nas três amostras de pão (com ingrediente natural, controlo e com conservante sintético) nos dois tempos de armazenamento definidos (0 e 3 dias). Foram feitas medidas em três pontos diferentes utilizando em medidor de pH digital (Halo pH/ Temp pobre, Hanna instruments, Romania) (**Figura 20**).



Figura 20 - Medição do pH das amostras
(Fonte: Ana Luisa Pepinelli, 2022).

Textura. A avaliação de textura foi realizada usando um texturometro TA.XT Plus - Stable Micro Systems (Vienna Court, Godalming, Reino Unido) (**Figura 21**) com célula de carga de 30 kf. Realizou-se a análise do perfil de textura (TPA), que simula a mastigação da boca humana executando duas compressões da matriz, com recurso à sonda *P/35 Cylinder aluminium*. A velocidade antes e depois do teste foi ajustada para 3 mm/seg e a posição de alvo para 25 % de pressão começando com 50 g de força. Os resultados foram combinados e processados através de uma macro para alcançar todas as dimensões da textura, nomeadamente dureza, fraturabilidade, adesividade, flexibilidade, coesividade, viscosidade e resiliência. A análise dos resultados foi efetuada com recurso ao software Exponent.

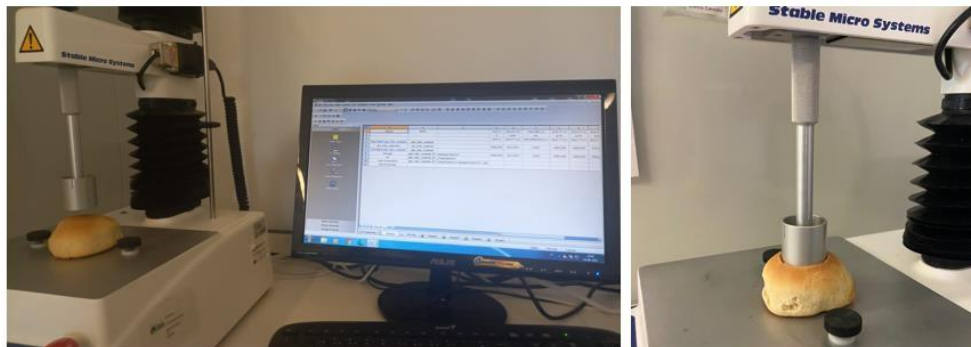


Figura 21 – Equipamento utilizado para avaliação de textura – texturômetro
(Fonte: Ana Luisa Pepinelli, 2022).

3.5.9 Avaliação do valor nutricional das amostras de pão de leite

Para avaliação do perfil nutricional nos tempos de armazenamento de 0 e 3 dias, foram determinados os teores de cinzas, gorduras, proteínas e energia para cada uma das amostras de pão (controle, com extrato natural e com aditivo sintético) assim como descrito anteriormente na *secção 3.3*.

3.5.10 Avaliação da atividade de água das amostras de pão de leite

Para medição da atividade de água (aw), os pães foram postos em cuvetes para a leitura no medidor Aqualab (4TE Decagon, WA, EUA) (**Figura 22**). O valor de aw foi registrado após a estabilização da medição.



Figura 22 – Medidor de atividade de água
(Fonte: Ana Luisa Pepinelli, 2022).

3.5.11 Avaliação da carga microbiana das amostras de pão de leite

A preparação das amostras para a análise da carga microbiana seguiu o procedimento descrito pela *International Organization for Standardization* (ISO, 2003). Os diferentes pães (10 g) foram misturadas com água peptonada (90 mL) em sacos de amostragem e posteriormente homogeneizadas em *stomacher* (Star Blender, VWR, Radnor, EUA) por 30 s (**Figura 23**). As suspensões obtidas foram ainda diluídas para obter diluições de 10^{-1} a 10^{-3} . Cada solução foi analisada em triplicata. Foram analisados Mesófilos totais, Coliformes, Bolores e leveduras, e *Bacillus cereus*.

Mesófilos totais: utilizou-se a técnica de semeadura por incorporação: 1 mL de cada diluição da amostra foi colocado em placa de Petri e foram adicionados 15 mL de Plate Count Agar (PCA). O procedimento foi realizado em duplicata. As placas foram então homogeneizadas e após a solidificação do meio, foram incubadas a 30 °C em

posição invertida por 72 h. A contagem foi realizada em placas contendo até 300 colônias (Limite de Quantificação (LOQ) = 1 log UFC (unidade formadora de colônia) /g).

Coliformes (ISO 4832:2006): As diluições foram inoculadas em meio VRBLA (*Violet Red Bile Lactose Agar*) (Liofilchem Co., Roseto degli Abruzzi, Itália) pela técnica de *pour plate*, em duplicata (LOQ = 1 log UFC/g). 1 mL de suspensão foi pipetado na placa e 15 mL de VRBLA (Liofilchem Co., Roseto degli Abruzzi, Itália) (mantido a 50 °C em um banho-maria ou incubadora) foram vertidos, homogeneizados e deixados para solidificar. As placas foram incubadas a 30 °C por 48 h, em posição invertida.

Bolores e leveduras (ISO 21527-1/2:2008): As diluições foram inoculadas em DRBC (Ágar dicloran rosa bengala cloranfenicol) (Liofilchem Co., Roseto degli Abruzzi, Itália) pela técnica de espalhamento em meio sólido, em duplicata (LOQ = 1,7 log UFC/g). 0,2 mL das suspensões foram pipetadas em uma placa contendo 15 mL do meio e espalhadas com um espalhador descartável (**Figura 23**). A incubação foi feita em 25 °C por 5 dias, na posição vertical. A contagem de colônias de leveduras e fungos foi realizada separadamente após 3 dias (Leveduras) e 5 dias (bolores) de incubação.

***Bacillus cereus* (ISO 7932:2004):** As diluições foram inoculadas em MYP (Ágar Manitol Gema de Ovo Polimixina) (Liofilchem Co., Roseto degli Abruzzi, Itália) pela técnica de espalhamento em meio sólido, em duplicata (LOQ = 1,7 log UFC/g). 0,2 mL da suspensão foram pipetados em uma placa contendo 15 mL do meio e foram espalhados com um espalhador descartável. A incubação foi realizada a 37 °C por 24 h, em posição invertida.

Todas as contagens da carga microbiana (**Figura 24**) foram realizadas nos mesmos intervalos de todos os outros ensaios deste trabalho, ou seja, T0 - imediatamente após o preparo e T3 - após 3 dias do preparo, prazo de validade estimado para produtos de panificação caseiro.

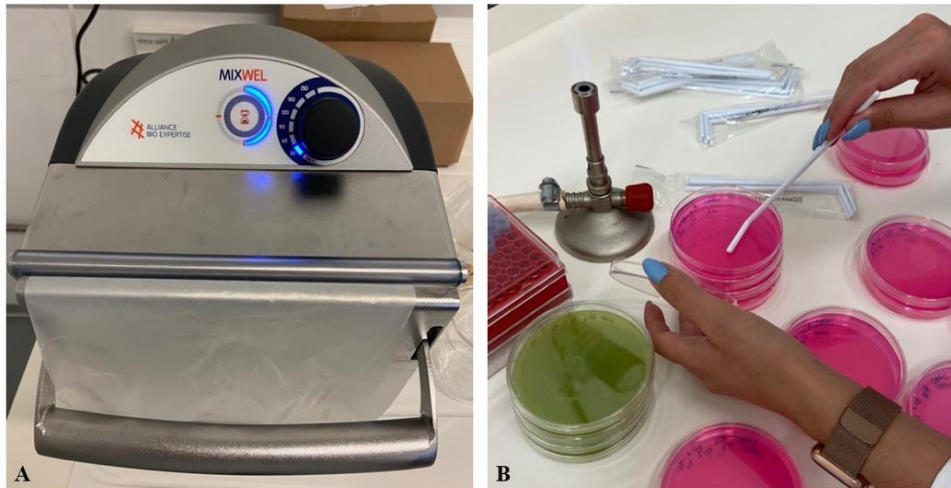


Figura 23 – Procedimentos para análise microbiana - Aparelho Stomacher (A) e espalhamento em meio sólido (B) (Fonte: Ana Luisa Pepinelli, 2022)

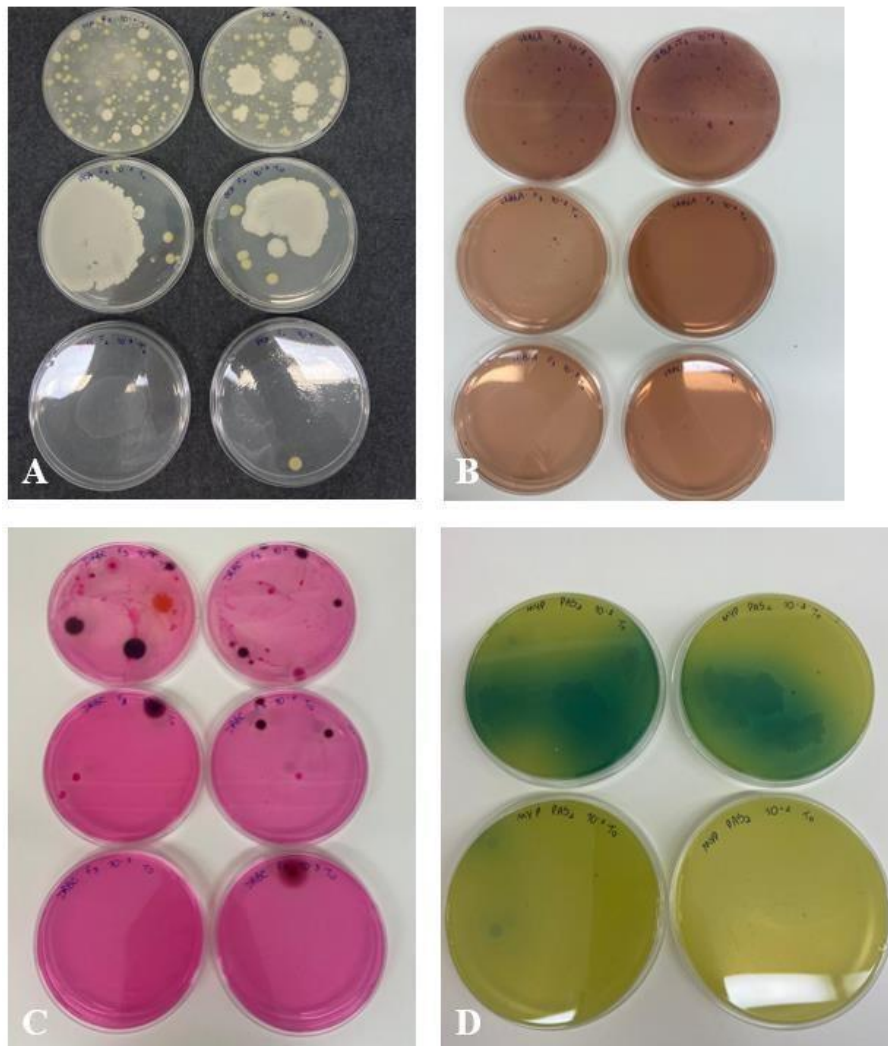


Figura 24 - Crescimento microbiano – Mesófilos totais (A), Coliformes (B), Bolores e leveduras (C) e *Bacillus cereus* (D) (Fonte: Ana Luisa Pepinelli, 2022).

3.6 Análise estatística

Os ensaios mencionados neste estudo foram realizados em triplicado e os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão (SD). A análise estatística dos dados foi efetuada com o intuito de determinar as diferenças significativas entre as diferentes amostras e foi realizada através de uma análise de variâncias *one-way* ANOVA e do teste de *Tukey*, tendo em conta os distintos tipos de comparações. Em cada tabela foi descrito qual o teste estatístico aplicado. Para tal, foi usado o programa RStudio, versão 4.1.1 (R Core Team, 2021, Vienna, Austria) com o pacote multcomp.

4 Resultados e discussão

4.1 Análise nutricional dos biorresíduos da *B. oleracea* var. *Acephala*

Os resultados obtidos na determinação do valor nutricional dos biorresíduos de *B. oleracea* var. *Acephala* (couve galega) estão presentes na **Tabela 6**. Os valores médios da composição em macronutrientes e minerais (cinzas) estão expressos em função da massa fresca (mf).

Tabela 6 – Composição nutricional dos biorresíduos de couve galega; (média \pm DP)

Componentes nutricional	Biorresíduos de couve galega
Humidade (g/100 g mf)	83,36 \pm 1
Proteínas (g/100 g mf)	2,44 \pm 0,01
Cinzas (g/100 g mf)	1,46 \pm 0,02
Gordura (g/100 g mf)	0,77 \pm 0,03
Hidratos de carbono (g/100 g mf)	11,98 \pm 0,02
Energia (Kcal/100 g)	64,55 \pm 0,2
Energia (Kj/100 g)	270,46 \pm 1

A couve galega apresentou alto teor de humidade (83,36 g/100 g mf) e um baixo valor energético (64,55 Kcal/100 g mf). Os macronutrientes maioritários foram os hidratos de carbono (11,98 g/100 g mf), seguido pelas proteínas (2,44 g/100 g mf); enquanto os minoritários foram as gorduras (0,77 g/100 g mf). Os minerais (cinzas) apresentam-se como o terceiro componente mais presente na hortaliça (1,46 g/100 g mf).

A composição nutricional dos biorresíduos de couve galega (**Tabela 6**) quando comparadas com os valores disponíveis pela literatura relativamente a esta hortaliça (**Tabela 4**) apresentam-se similares. Os teores de proteína e gordura apresentaram uma diminuição de 4,28 g/100 g mf na hortaliça para 2,44 g/100 g mf no resíduo (proteína) e de 0,93 g/100 g mf na hortaliça para 0,77 g/100 g mf no resíduo (gordura); em contrapartida, os valores de hidratos de carbono e energia apresentaram um aumento de 8,75 g/100 g mf na hortaliça para 11,98 g/100 g mf no resíduo (hidratos de carbono) e de 49 Kcal/100 g mf na hortaliça para 64,55 Kcal/100 g mf no resíduo (energia). Desta forma, pode constatar-se que os resíduos da couve galega do presente estudo não apresentam perda significativa quanto às componentes nutricionais da hortaliça destinada a comercialização e consumo.

Para além disso, mostram-se como um possível alimento de valor agregado que possui papel crucial na dieta humana; pois os resíduos apresentaram um elevado valor nutricional, sendo uma fonte rica em proteínas (2,44 g/100 g mf) e hidratos de carbono (11,98 g/100 g mf), mas de baixa contribuição calórica (64,55 Kj/100 g mf), consequência do seu reduzido teor em gordura (0,77 g/100 g mf). Tais informações são importantes pois o conhecimento das propriedades nutricionais juntamente com o valor calórico permite que o consumidor escolha o alimento mais adequado a sua alimentação, a couve galega é uma hortaliça considerada muito saudável.

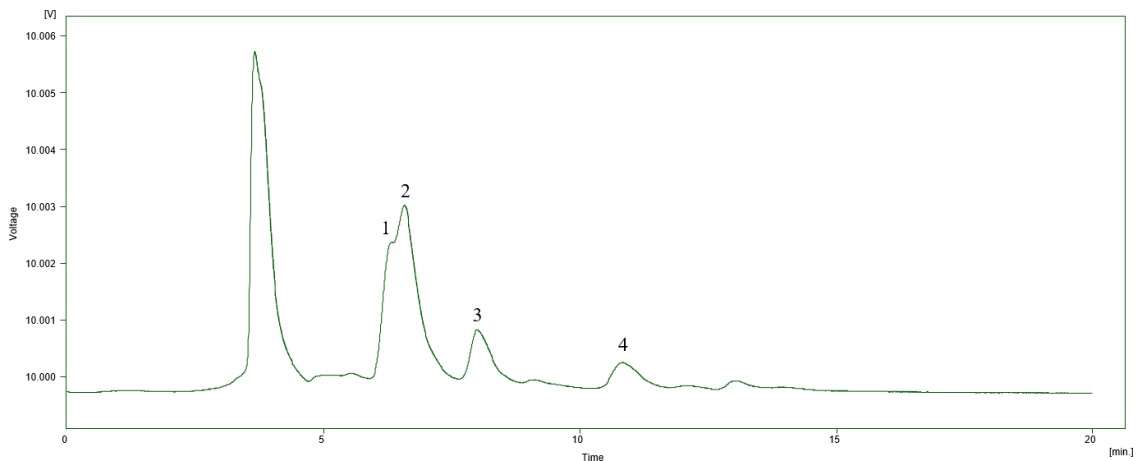
4.2 Análise química dos biorresíduos da *B. oleracea* var. *Acephala*

A **Tabela 7** apresenta os resultados obtidos nas análises químicas dos biorresíduos de *B. oleracea* var. *Acephala*. O teor de açúcares e ácidos orgânicos estão expressos em g/100 g de mf, enquanto o teor de ácidos gordos está expresso em percentagem relativa. As **Figuras 25, 26 e 27** apresentam os cromatogramas referentes aos açúcares, ácidos orgânicos e ácidos gordos, respectivamente.

Tabela 7 - Composição em açúcares, ácidos orgânicos e ácidos gordos dos biorresíduos de *B. oleracea* var. *Acephala*; (média \pm DP).

Açúcares (g/100 g mf)	
Frutose	1,010 \pm 0,005
Glicose	1,44 \pm 0,02
Sacarose	0,59 \pm 0,02
Total	3,04 \pm 0,01
Ácidos orgânicos (g/100 g mf)	
Oxálico	0,18 \pm 0,01
Málico	0,60 \pm 0,02
Ascórbico	0,008 \pm 0,0002
Cítrico	0,56 \pm 0,01
Fumárico	0,0041 \pm 0,0001
Total	1,35 \pm 0,01
Ácidos gordos (%)	
C16:0	15,8 \pm 0,1
C18:0	4,4 \pm 0,1
C18:2n6c	16 \pm 1
C18:3n3	36,3 \pm 0,2
<i>Desconhecido</i>	27,5 \pm 0,4
SFA	20,08 \pm 0,04
MUFA	-
PUFA	52,4 \pm 0,4

mf: massa fresca; Ácido palmítico (C16:0); Ácido esteárico (C18:0); Ácido α -linoleico (C18:2n6c); Ácido linolênico (C18:3n3); SFA: ácidos gordos saturados; MUFA: ácidos gordos monoinsaturados; PUFA: ácidos gordos poli-insaturados. Os resultados são expressos em média \pm desvio padrão.

**Figura 25** – Cromatograma dos açúcares – Frutose (1), Glicose (2), Sacarose (3) e Melezitose (PI) (4).

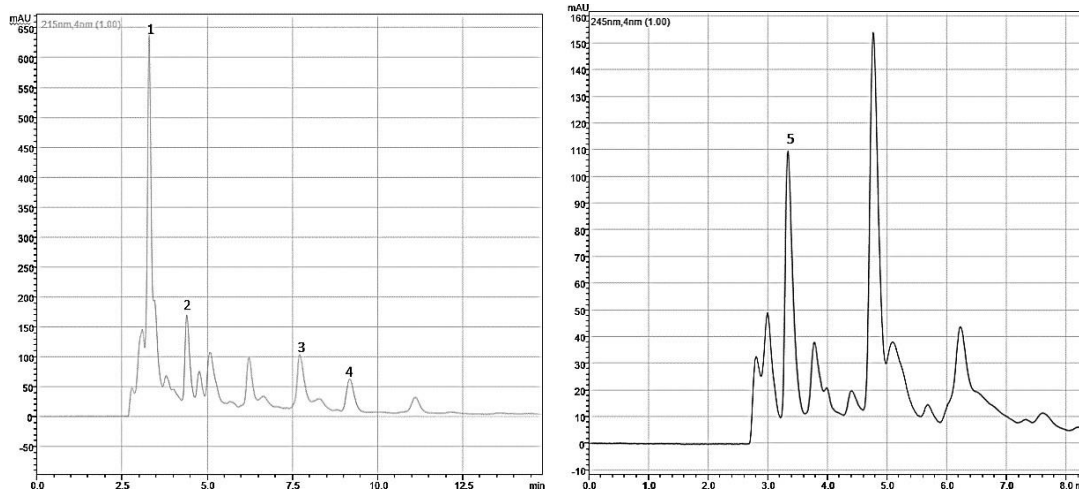


Figura 26 – Cromatograma dos ácidos orgânicos a 215 e 245nm– Oxálico (1), Málico (2), Cítrico (3), Fumárico (4) e Ascórbico (5).

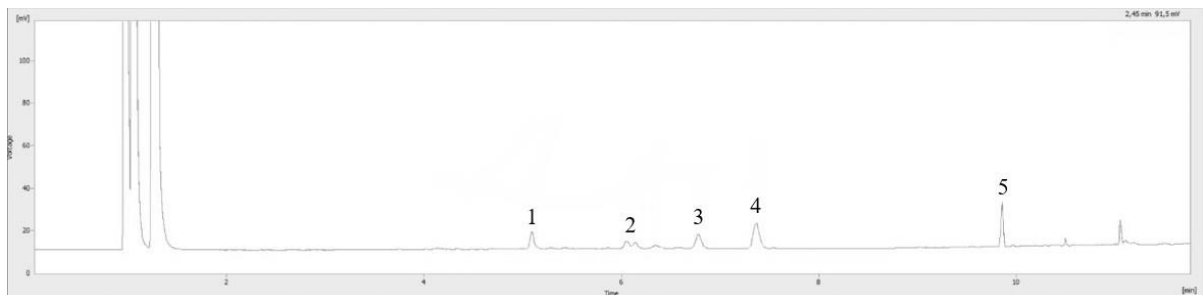


Figura 27 – Cromatograma dos ácidos gordos - Ácido palmítico (1); Ácido esteárico (2); Ácido α -linoleico (3); Ácido linolênico (4); Desconhecido (5).

Tendo em conta a composição do perfil individual de açúcares livres, a amostra estudada apresentou dois monossacarídeos (frutose e glicose) e um dissacarídeo (sacarose). Os monossacarídeos foram encontrados em quantidades superiores, sendo a glicose a que possui maior concentração (1,44 g/100 g mf) seguida da frutose (1,01 g/100 g mf). O dissacarídeo, sacarose, foi o açúcar minoritário apresentando valores de 0,59 g/100 g mf.

Não foram encontrados estudos para a espécie *Brassica oleracea* var. *Acephala*, o que atribui novidade a este trabalho de investigação. No entanto, para comparação de dados foram utilizados diversos estudos disponíveis na literatura referentes à família *Brassicaceae* (família onde esta hortaliça pertence).

Favela-González et al. (2020) fizeram uma revisão em relação à composição química de vegetais da família *Brassicaceae* e constataram que em hortaliças do gênero

Brassica; a frutose, glicose e sacarose são os açúcares mais representativos, sendo que suas concentrações possuem grande influência do sabor dos vegetais.

Bhandari & Kwak (2015) também estudaram a composição química em outros produtos vegetais (seis cultivares de couve-flor e brócolos) e tecidos de hortaliças do gênero *Brassica*. Estes autores identificaram a presença dos açúcares glicose, frutose e sacarose, apontando a glicose como o açúcar mais abundante em todas as amostras, seguida pela frutose e depois pela sacarose. Além disso, sugeriram que o teor de açúcar livre nas culturas de *Brassica* é dependente, não apenas do genótipo da cultura, mas também do tecido vegetal específico.

A pequena discrepância de resultados observada entre o teor de açúcares obtidos nos biorresíduos do presente estudo (3,03 g/100 g mf) e os dados descritos na literatura (2,26 g/100 g mf) (**Tabela 4**), pode ser explicado devido à diferença de cultivares, variedades e condições de cultivo.

Em relação ao perfil individual de ácidos orgânicos (**Tabela 7**), foram identificadas cinco moléculas, nomeadamente os ácidos oxálico, málico, ascórbico, cítrico e fumárico. O ácido málico destacou-se como maioritário (0,60 g/100 g mf), seguido pelos ácidos cítrico (0,56 g/100 g mf) e oxálico (0,19 g/100 g mf). Os ácidos ascórbico (0,008 g/100 g mf) e fumárico (0,0041 g/100 g mf) apresentaram concentrações consideravelmente inferiores.

Os dois principais ácidos encontrados na couve galega, o ácido málico e o ácido cítrico, estão entre os ácidos orgânicos mais comuns nas frutas, apresentando atividade antimicrobiana (Dian et al., 2020). Esses ácidos possuem cadeia curta (málico com 4 carbonos e o cítrico com 6) e estão relacionados com a atividade antimicrobiana devido à redução do pH e à capacidade de dissociação. Estes dois compostos podem ser utilizados como auxiliares nos processos de conservação de carnes (Pierozan et al., 2021).

Para além disso, ambos desempenham diferentes papéis quanto a sua aplicação na indústria alimentar. O ácido málico, por exemplo, pode atuar como acidulante e intensificador de sabor em vários produtos, incluindo doces, refrigerantes, produtos de panificação e geleias (Kövilein et al., 2020).

Vale et al. (2015) caracterizaram os principais compostos fenólicos, perfil de ácidos orgânicos e atividade antimicrobiana de quatro variedades de *Brassicac oleracea*, (repolho roxo, brócolis, couve galega e repolho penca) em forma de brotos produzidos de

duas formas diferentes. Em uma das formas de produção dos brotos de couve galega, os autores identificaram o ácido oxálico como o ácido orgânico principal, seguido dos ácidos cítrico e málico; enquanto na outra forma, apesar de manter o ácido oxálico como o composto principal, os ácidos maleico e málico tomaram posições diferentes, sendo que o cítrico não foi identificado. O autor conclui que o teor de ácidos orgânicos, assim como o de outros componentes, é significativamente influenciado pelas condições de cultivo.

A diferença que está patente entre os valores obtidos no presente estudo e os dados disponíveis na literatura pode justificar-se devido a fatores genéticos e de cultivo das plantas (espécie, idade da planta, tecido vegetal).

Na avaliação do perfil individual de ácidos gordos (**Tabela 7**), foram identificados cinco compostos, sendo o ácido linolénico (C18:3n3) o composto maioritário, com 36,2 %, seguido pelos ácidos não identificado com 27,5 %, α -linoleico (C18:2n6c) com 16 %, palmítico (C16:0) com 15,7 % e esteárico (C18:0) com 4,3 %.

Vale ressaltar que o ácido foi denominado como não identificado pois não foi encontrado correspondente no padrão utilizado na análise cromatográfica. No entanto, devido à sua relevância a nível de concentração este foi considerado durante a quantificação. O seu tempo de retenção foi de 9,86 min conforme demonstrado na **Figura 27** seguindo as especificações de análise descritas na metodologia (**secção 3.4.3**).

Vale et al. (2015) estudaram as mudanças na composição nutricional de quatro variedades de *Brassica oleracea* (repolho roxo, brócolis, couve galega e repolho penca) em forma de brotos produzidos de duas formas diferentes. Os autores verificaram através da análise por cromatografia gasosa, que em ambas as formas de cultivo na couve galega, alguns dos principais ácidos gordos encontrados foram os ácidos erúcido (C22:1n9), α -linoleico (C18:2n6c) e oleico (C18:1n9c).

Por outro lado, Cacciola et al. (2016) realizaram a caracterização química do óleo extraído das sementes de *B. oleracea* L. var. *Acephala* e também identificaram, através da análise por cromatografia gasosa, o ácido erúcido (C22:1n9), ácido α -linoleico (C18:2n6c) e linolênico (C18:3n3), como os principais ácidos gordos presentes nessa espécie.

Também Ayaz et al. (2006) identificaram os principais ácidos gordos encontrados na couve (*B. oleraceae* L. var. *Acephala* DC), através de um sistema de cromatografia gasosa, e constataram que o ácido eurúcio (C22:1n9) é o ácido gordo maioritário (45,7

%) nas sementes, seguido pelos ácidos oleico (C18:1n9c) (14,8 %) e α -linoleico (C18:2n6c) (12,8 %).

Relacionando os principais ácidos gordos presentes na couve galega apontados pela literatura, com os ácidos gordos presentes na amostra do presente estudo, suspeita-se que o ácido não identificado seja o ácido erúico (C22:1n9). Esta suspeição deve-se ao facto de diversos autores apontarem este ácido como um dos principais compostos presentes em espécies de *B. oleracea*. Contudo, apesar de não ter sido possível fazer a identificação de um dos compostos detetados no perfil individual de ácidos gordos, os resultados obtidos corroboram com os dados disponíveis na literatura (**Tabela 4**), dado que os ácidos gordos polinsaturados foram os que apresentaram maior ocorrência em ambos, seguido pelos saturados e, por último, os monoinsaturados. Todos estes resultados, mais uma vez, comprovam, que os bioresíduos não apresentam diferença significativa na sua composição, quando comparados com a hortaliça destinada a comercialização e consumo. Não obstante, a espécie *B. oleracea* var. *Acephala* apresenta grande relevância nutricional, pois os ácidos gordos insaturados promovem o bom funcionamento dos vasos sanguíneos o que, por sua vez, promove a redução do risco de ocorrência de problemas cardiovasculares (Bhandari & Kwak, 2015).

A discrepância entre os valores obtidos no presente estudo e os valores encontrados na literatura estão relacionados com o estágio de maturidade em que a hortaliça em estudos se encontram, local de cultivo e condições ambientais, entre outros fatores externos.

Em relação a análise de fenóis e flavonóides totais, o extrato hidroetanólico obtido a partir dos biorresíduos da *B. oleracea* var. *Acephala* apresentou concentrações de 5 mg GAE/g de fenóis totais e 2,4 mg CE/g de flavonóides totais.

Os valores obtidos comprovam o que está descrito na literatura, apresentando-se nas gamas de concentração apontadas por outros autores que categorizaram os vegetais do gênero *Brassica oleracea* como sendo um alimento rico em fenóis e flavonóides.

Thomas et al. (2018) objetivaram a caracterização e quantificação do subproduto industrial de bróculos (*Brassica oleracea* var. *italica*). Estes constataram que os teores totais de fenóis e flavonóides, entre os diferentes cultivares de sementes e segmentos vegetais dos subprodutos de bróculos (compostos por talos e segmentos residuais combinados após o processamento) variaram de $3,8 \pm 0,2$ a $6,1 \pm 0,3$ mg GAE/g de

matéria seca para fenóis totais e $2,4 \pm 0,1$ a $5,4 \pm 0,6$ mg CE/g de matéria seca para flavonóides totais.

Um dos objetivos de Aydin (2020), foi também analisar a quantidade de fenóis e flavonóides totais nas folhas e no caule de duas espécies de plantas (*Brassica oleracea* var. *acephala* – couve galega e *Ornithogalum umbellatum*- flor Estrela-de-Belém). O autor constatou que a espécie *Brassica* apresentou boas concentrações de fenóis e flavonóides tanto no caule como nas folhas, sendo que as maiores concentrações foram encontradas nas folhas. *B. oleracea* var. *acephala* apresentou maior concentração de fenóis do que a espécie *O. umbellatum*.

4.3 Avaliação das propriedades bioativas do extrato hidroetanólico da *B. oleracea* var. *Acephala*

Para a avaliação das propriedades bioativas do extrato hidroetanólico, obtido a partir dos biorresíduos de *B. oleracea* var. *Acephala*, foram analisadas as atividades antioxidantes, anti-inflamatória, citotóxica e antimicrobiana, através de ensaios *in vitro*.

4.3.1 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi determinada através de dois ensaios colorimétricos *in vitro*, inibição da peroxidação lipídica (TBARS) e atividade antioxidante celular (CAA).

Relativamente ao ensaio TBARS que baseia-se na atividade antioxidante via ação enzimática, com objetivo de redução da peroxidação lipídica (Gorni et al., 2019), a concentração de amostra necessária para oferecer 50% desta atividade antioxidante (EC₅₀) do extrato hidroetanólico de couve galega foi de 19 µg/mL. Um valor baixo que revela que o extrato possui boa atividade antioxidante e exerce efeito protetor contra a peroxidação lipídica.

Em relação à atividade antioxidante celular (CAA), que mede a capacidade que os compostos antioxidantes possuem em prevenir a formação do radical peroxidil (produto reativo da oxidação lipídica) em células, a maior concentração de extrato testada foi de 2 000 µg/mL. Sendo essa concentração de extrato responsável por 40 % de inibição, apresentando resultados satisfatórios considerando que em uma concentração baixa o extrato apresentou uma elevada porcentagem de inibição.

Portanto, a eficiência deste método (CAA) está diretamente ligada com a presença de compostos fitoquímicos que vão atuar como antioxidantes. Entre os fitoquímicos que apresentam maior atividade antioxidante celular estão os flavonóides, nomeadamente a quercetina e o Kaempferol. Esta classe de fitoquímico é a mais importante presente na *Brassica oleracea*, o que justifica a elevada porcentagem de inibição apresentada pelo método (Favela-González et al., 2020; K. L. Wolfe & Rui, 2007).

4.3.2 Atividade anti-inflamatória e citotóxica

Os resultados relativos aos ensaios de citotoxicidade e toxicidade obtidos estão apresentados na **Tabela 8**. Os extratos hidroetanólicos obtidos a partir dos biorresíduos de *B. oleracea* var. *Acephala*, nas concentrações testadas, não apresentaram capacidade antiproliferativa em nenhuma das linhas celulares tumorais (AGS, CaCo, MCF-7 e NCI-H460). Isso é notório devido a todos os valores de GI_{50} serem superiores a 400 ($GI_{50} > 400 \mu\text{g/mL}$).

Quanto a avaliação da toxicidade, onde foi utilizado uma linha celular não-tumoral obtida através de rim de macaco (VERO), o resultado indicou que o extrato não demonstrou toxicidade na concentração máxima testada ($GI_{50} > 400 \mu\text{g/mL}$), o que permite afirmar que a sua ingestão é segura.

Tabela 8 – Atividade citotóxica, toxicidade e atividade anti-inflamatória do extrato hidroetanólico obtido a partir dos bioresíduos de *B. oleracea* var. *Acephala*

Atividade Citotóxica	GI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
AGS	> 400
CaCo	> 400
MCF-7	> 400
NCI-H460	> 400
VERO	> 400
Atividade Anti-inflamatória	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
RAW 264,7	> 400

AGS: adenocarcinoma gástrico; CaCo: adenocarcinoma colorretal; MCF-7: carcinoma da mama; NCI-H460: carcinoma de pulmão; VERO: linha não tumoral; RAW 264,7: células macrófagos de rato.

A atividade anti-inflamatória avaliada através de um ensaio *in vitro*, utilizando células de macrófagos RAW 264,7 de rato, está presente na **Tabela 8**. Os resultados

mostraram que nas concentrações testadas, o extrato não apresentou atividade anti-inflamatória ($IC_{50} > 400 \mu\text{g/mL}$).

Apesar dos resultados obtidos não terem provado o potencial citotóxico e anti-inflamatório do extrato de couve galega para as concentrações testadas (0,125 a 8 mg/mL), não implica que o extrato não possui estas atividades, uma vez que se testados em maiores concentrações podem apresentar valores de GI_{50} (concentração de amostra que inibirá 50 % do crescimento celular) e IC_{50} (concentração de amostra em que inibirá 50% da produção de óxido nítrico) satisfatórios.

Não foram encontrados estudos de atividade anti-inflamatória e citotoxicidade referentes à espécie *B. oleracea* var. *Acephala* o que, mais uma vez, mostra o carácter inovador deste estudo.

4.3.3 Atividade antimicrobiana

Os resultados obtidos nos ensaios de atividade antimicrobiana do extrato hidroetanólicos obtidos a partir de *B. oleracea* var. *Acephala* estão presentes na **Tabela 9**. Os valores exibem a menor concentração necessária para inibição de 50 % do crescimento dos fungos e das bactérias (CMI) e a concentração mínima bactericida (CMB) e fungicida (CMF).

Foram utilizados na análise bactérias patogénicas Gram-positivos (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes*) e Gram-negativos (*Escherichia coli*, *Salmonella thyphimurium* e *Enterobacter cloacae*), e também fungos (*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus versicolor*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium* e *Trichoderma viride*).

Considerando os resultados obtidos, todos evidenciaram capacidade bacteriostática e bactericida frente às estirpes estudadas, sendo que *Bacillus cereus* destacou-se por ser a bactéria mais suscetível ao extrato, tendo concentração de 1 mg/mL para CMI e 2 mg/mL para CMB. Enquanto para todas as outras estirpes os valores de CMI e CMB foram os mesmos, sendo 2 mg/mL e 4 mg/mL respectivamente.

Quando comparado a atividade antimicrobiana do extrato de couve galega com a dos conservantes E211 e E224 (usados como controlos positivos), o extrato destaca-se por possuir melhor atividade (CMI: 1 mg/mL e CMB: 2 mg/mL) para *Bacillus cereus* do que o E224 (CMI: 2 mg/mL e CMB: 4 mg/mL). Destaca-se também por apresentar

atividade igual ao E211 para *Enterobacter cloacae*, sendo CMI de 2 mg/mL e CMB de 4 mg/mL.

Em relação a atividade antifúngica, o extrato apresentou valores satisfatórios para todas as estirpes testadas, sendo que para todas elas a concentração de CMI e CMF foram iguais ou inferior quando comparadas aos conservantes já utilizados. *Aspergillus fumigatus* e *Penicillium fumiculosum* destacam-se como os fungos mais suscetíveis a ação do extrato, com valores menores de CMI e de CMF (0,5 mg/mL e 0,25 mg/mL, respectivamente).

Tabela 9 - Atividade antibacteriana (CMI e CMB mg/mL) e antifúngica (CMI e CMF mg/mL) do extrato obtido a partir dos bioresíduos de *B. Oleracea*. var acephala.

Atividade Antibacteriana							
Extratos		<i>S.a.</i>	<i>B.c.</i>	<i>L.m.</i>	<i>E.c.</i>	<i>S.t.</i>	<i>En.cl.</i>
Couve G.	CMI	2	1	2	2	2	2
	CMB	4	2	4	4	4	4
E211	CMI	4	0,5	1	1	1	2
	CMB	4	0,5	2	2	2	4
E224	CMI	1	2	0,5	0,5	1	0,5
	CMB	1	4	1	1	1	0,5

Atividade Antifúngica							
Extratos		<i>A.f.</i>	<i>A.n.</i>	<i>P.f.</i>	<i>P.v.c.</i>	<i>T.v.</i>	
Couve G.	CMI	0,25	0,5	0,25	0,5	0,5	
	CMF	0,5	1	0,5	1	1	
E211	CMI	1	2	1	2	1	
	CMF	2	2	2	4	2	
E224	CMI	1	1	0,5	1	0,5	
	CMF	1	1	0,5	1	0,5	

S.a.: *Staphylococcus aureus*; *B.c.*: *Bacillus cereus*; *L.m.*: *Listeria monocytogenes*; *E.c.*: *Escherichia coli*; *S.t.*: *Salmonella Typhimurium*; *En.cl.*: *Enterobacter cloacae*; *A.f.*: *Aspergillus fumigatus*; *A.v.*: *Aspergillus versicolor*; *P.f.*: *Penicillium fumiculosum*; *P.v.c.*: *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium*; *T.v.*: *Trichoderma viride*; .
CMI: concentração mínima inibitória, CMB: concentração mínima bactericida; CMF: concentração mínima fungicida. (Benzoato de sódio-E211 e Metabissulfito de potássio-E224)

Também Ayaz et al. (2008) avaliaram o extrato metanólico de *B. oleraceae* var. *Acephala* DC quanto a sua atividade antibacteriana e, constataram uma efetiva inibição do crescimento das bactérias Gram-positivos *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter faecalis*, *Bacillus subtilis* e da bactéria Gram-negativo *Moraxella catarrhalis*.

Waghulde et al. (2019) também estudaram a atividade antimicrobiana e, constataram uma ampla atividade antibacteriana de extratos hidroetanólicos de *Brassica oleracea* var. capitata em relação a bactérias gram positivos (*Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*) e gram negativos (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*).

Estudos comparativos entre *B. oleraceae* var. Acephala e a atividade antifúngica referente às estirpes testadas neste trabalho de investigação não foram encontrados. Porém, Aydin (2020) objetivou também o estudo da atividade antifúngica de dois extratos etanólicos de duas plantas diferentes, sendo uma delas a *B. oleracea* var. acephala. O autor constatou que o extrato de couve apresentou boa atividade antifúngica contra *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, e *Saccharomyces cerevisiae*.

4.4 Estudo de incorporação do ingrediente natural obtido a partir dos biorresíduos de *B. Oleracea* var. Acephala em pães de leite.

O estudo da incorporação do extrato hidroetanólico obtido a partir dos bioresíduos de *B. Oleracea* var. Acephala num produto de padaria (pão de leite) foi avaliado através de análises físicas (textura, cor, pH, atividade de água), nutricionais (proteínas, gordura, cinzas, hidratos de carbono, energia) e determinação da carga microbiana. Para verificar possíveis diferenças significativas destes parâmetros foi realizada a comparação estatística. A comparação foi feita de forma individual para cada análise. As amostras (controle, com o ingrediente natural e com o conservante alimentar) foram comparadas entre si dentro do mesmo tempo de armazenamento e, para além disso, foi feita a comparação individual para cada uma das amostras entre os dois tempos de armazenamento (0 e 3 dias).

4.4.1 Avaliação dos parâmetros físicos

Textura. Para a avaliação da textura foi aplicado um método que simula a mastigação humana. Desta forma, foram considerados os parâmetros de dureza (força que os dentes têm que aplicar no alimento para o deformar), elasticidade (taxa em que o alimento deformado reverte ao estado não deformado), coesividade (capacidade do alimento para resistir a uma segunda deformação), viscosidade, mastigabilidade (produto da dureza, coesão e elasticidade, definida como a energia para mastigar o alimento) e

resiliência (semelhante à elasticidade, envolve a velocidade e a força da recuperação do alimento). A análise foi realizada nas três amostras de pão (controle, com aditivo sintético e com ingrediente natural), nos dois tempos de armazenamento (T0 e T3 dias). Os resultados obtidos, assim como o tratamento estatístico aplicado entre as amostras e os tempos, estão descritos na **Tabela 10**.

Tabela 10 – Avaliação da textura nas amostras de pão, durante os tempos de armazenamento 0 e 3 dias.

	Controlo	Aditivo sintético	Ingrediente natural
Dureza (g)			
T0	1961±40 ^{a,A}	1020±3 ^{b,A}	2880±117 ^{c,A}
T3	55326±134 ^{a,B}	3758±150 ^{b,B}	8556±395 ^{c,B}
Elasticidade (%)			
T0	0,93±0,01 ^{a,A}	0,93±0,01 ^{a,A}	0,58±0,01 ^{a,A}
T3	0,84±0,01 ^{a,B}	0,73±0,01 ^{b,B}	0,81±0,01 ^{a,B}
Coabilidade (%)			
T0	0,69±0,01 ^{a,A}	0,61±0,02 ^{b,A}	0,58±0,01 ^{b,A}
T3	0,35±0,02 ^{a,B}	0,34±0,01 ^{a,B}	0,38±0,01 ^{a,B}
Viscosidade (%)			
T0	1346±47 ^{a,A}	612±30 ^{b,A}	1660±40 ^{c,A}
T3	1012±1414 ^{a,B}	1266,1±0,1 ^{a,B}	3339±81 ^{a,B}
Mastigabilidade (%)			
T0	1257±36 ^{a,A}	567±19 ^{b,A}	1502±118 ^{c,A}
T3	857±1197 ^{a,B}	925±13 ^{a,B}	2565±95 ^{b,B}
Resiliência (%)			
T0	0,261±0,003 ^{a,A}	0,206±0,009 ^{b,A}	0,218±0,011 ^{b,A}
T3	0,119±0,026 ^{a,B}	0,106±0,001 ^{a,B}	0,121±0,003 ^{a,B}

^{a-c} Os valores médios na mesma linha não seguidos por um sobrescrito comum diferem significativamente entre as amostras (Controle, Aditivo sintético e Conservante natural) pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

^{A-B} Os valores médios na mesma coluna não seguidos por um sobrescrito comum diferem significativamente ao longo do tempo de armazenamento (T0 e T3) pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Em relação ao tempo de armazenamento, todas as amostras apresentaram diferenças estatisticamente significativas em todos os parâmetros de textura analisados. Comprando as amostras entre si no tempo 0 dias, verificou-se que os pães de leite com incorporação do ingrediente natural e com o aditivo sintético apresentaram diferenças significativas em todos os parâmetros exceto na elasticidade, quando comparadas com a amostra controle. Por outro lado, comparando as amostras entre si no tempo 3 dias, os pães de leite apresentaram diferença significativas apenas para os parâmetros de dureza e elasticidade, sendo semelhantes a nível de coabilidade, viscosidade, mastigabilidade e resiliência.

Fazendo a comparação ao longo do tempo de armazenamento, constatou-se que todas as amostras sofreram alterações em todos os parâmetros de textura analisados, ou seja, não se verificou efeito significativo consequente da incorporação dos diferentes ingredientes na manutenção da textura, ao final de 3 dias.

Relativamente aos dados da literatura, não foram encontrados estudos que comparem os parâmetros de texturas de pães de leite com a incorporação de aditivos sintético ou natural. No entanto, Ribotta et al. (2010) determinaram a influência da incorporação de três aditivos (de forma combinada) nos aspectos de qualidade experimental de pães de trigo. Os autores constataram que o uso dos aditivos alterou significativamente as propriedades de textura do pão, estando os valores apresentados associados à diminuição da qualidade.

Cor. A análise cromática no espaço de cor CIE L^* (luminosidade), a^* e b^* (coordenadas cromáticas) foi realizada nas três amostras de pão (controle, com aditivo sintético e com ingrediente natural) durante os dois tempos de armazenamento (T0 e T3 dias). Os resultados obtidos com o colorímetro, assim como a coloração no sistema RGB (Vermelho, verde e azul) e o tratamento estatístico, aplicado entre as amostras e os tempos de armazenamento, estão descritos na **Tabela 11**. A análise foi realizada individualmente para cada um dos parâmetros: casca e miolo.

A análise comparativa da cor da casca entre as amostras logo após a confecção (T0 dias) mostrou que, em geral, não foram observadas diferenças significativas, excepto no parâmetro de cor a^* , em que os pães com aditivo sintético e extrato natural se destacaram do pão controle. Ao fim de 3 dias de armazenamento, apenas o pão com o ingrediente natural apresentou diferença significativa quando comparado com o pão controle.

No que concerne à cor do miolo, fazendo a comparação entre as amostras para cada tempo, em T0 poucas foram as variações observadas. A diferença deu-se apenas para o parâmetro b^* , onde o pão com ingrediente natural apresentou diferença significativa comparativamente com a amostra controle. Já no tempo T3, podem ser observadas variações em todos os parâmetros. Sendo que o pão com ingrediente natural mostrou semelhanças com o pão controle em dois (L^* e a^*) dos três parâmetros.

Estas diferenças podem ser explicadas pelo facto de o processo de produção dos pães terem sido em ambiente caseiro, o que pode interferir no rigor absoluto de confecção; ou seja, estas alterações podem não estar relacionadas com a adição de cor por parte da incorporação do ingrediente natural.

Num estudo realizado por Sousa (2012) relativamente à incorporação de aditivos alimentares na produção de pão pré cozido congelado; a autora obteve valor de luminosidade de $79,60 \pm 2,40$ e cromaticidade de $-0,24 \pm 0,12$ (a^*) e $13,29 \pm 1,63$ (b^*) para o miolo do pão controle, e valores de luminosidade entre 72,53 e 77,89 e cromaticidade entre -0,22 e -1,23 (a^*), 16,17 e 12,64 (b^*) para o miolo de pães com adição de aditivos sintéticos. Os valores apresentam-se numa faixa parecida, porém pelas discrepâncias com o presente estudo deve-se, provavelmente, ao fato da autora utilizar aditivos diferentes e em quantidade diferentes e também às condições de produção dos pães serem outras (ingredientes, tempo de fermentação, tempo de forno).

Na literatura não existem trabalhos relativamente à colorimetria comparativa em pães com aditivos sintéticos e pães com aditivos naturais; no entanto os autores Caleja et al. (2017) fizeram um estudo comparativo entre antioxidantes naturais e sintéticos em biscoitos e concluíram que a incorporação dos aditivos não causou alterações significativas na cor dos biscoitos quando comparados a amostra controlo.

Tabela 11 – Avaliação dos parâmetros de cor das amostras de pão durante os tempos de armazenamento T0 e T3 dias.

	T0				T3			
	L*	a*	b*	RGB	L*	a*	b*	RGB
Cor da casca								
Controle	61±3 ^{a,A}	12,5±0,3 ^{a,A}	39,2±0,3 ^{a,A}		61±3 ^{a,A}	12,4±0,3 ^{a,A}	38±1 ^{a,A}	
Aditivo sintético	60±2 ^{a,A}	10,2±0,5 ^{b,A}	38±1 ^{a,A}		60±0,1 ^{a,A}	11,9±0,3 ^{a,B}	38,1±0,5 ^{a,A}	
Ingrediente natural	62±0,5 ^{a,A}	10±0,2 ^{b,A}	40±0,5 ^{a,A}		62±1 ^{a,A}	10±0,5 ^{b,A}	39±1 ^{a,A}	
Cor do miolo								
Controle	81±0,1 ^{a,A}	-1,9±0,1 ^{a,A}	21,9±0,3 ^{a,A}		82±1 ^{a,A}	-1,6±0,1 ^{a,B}	21±1 ^{a,A}	
Aditivo sintético	78,8±0,1 ^{a,A}	-2,01±0,04 ^{a,A}	23±1 ^{a,A}		74±1 ^{b,B}	-1,7±0,1 ^{b,B}	21,1±0,2 ^{b,B}	
Ingrediente natural	80±0,5 ^{a,A}	-3±0,1 ^{a,A}	26±0,3 ^{b,A}		80±2 ^{a,A}	-2,290±0,005 ^{a,A}	25±0,4 ^{c,A}	

^{a-c} Os valores médios na mesma coluna não seguidos por um sobrescrito comum diferem significativamente entre as amostras (Controle, Aditivo sintético e Conservante natural) pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

^{A-B} Os valores médios na mesma linha não seguidos por um sobrescrito comum diferem significativamente ao longo do tempo de armazenamento (T0 e T3) pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

pH. A avaliação do pH foi realizada nas três amostras de pão (controle, com aditivo sintético e com ingrediente natural) durante os dois tempos de armazenamento (T0 e T3 dias). Os resultados obtidos, assim como o tratamento estatístico aplicado entre as amostras e entre os tempos de armazenamento, estão descritos na **Tabela 12**.

Tabela 12 – Avaliação do pH das amostras de pão durante os tempos de armazenamento T0 e T3 dias.

	Controle	Aditivo sintético	Ingrediente natural
pH			
T0	5,93±0,03 ^{a,A}	5,78±0,09 ^{a,A}	5,91±0,07 ^{a,A}
T3	5,73±0,12 ^{a,A}	5,86±0,02 ^{a,A}	5,95±0,02 ^{a,A}

^{a-c} Os valores médios na mesma linha não seguidos por um sobrescrito comum diferem significativamente entre as amostras (Controle, Aditivo sintético e Conservante natural) pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

^{A-B} Os valores médios na mesma coluna não seguidos por um sobrescrito comum diferem significativamente ao longo do tempo de armazenamento (T0 e T3) pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Nas amostras de pão de leite os valores de pH oscilaram entre $5,73 \pm 0,12$ e $5,95 \pm 0,02$. Após a análise estatística foi possível constatar que as amostras não apresentaram diferença estatística quanto à variação do pH, nem entre cada tempo, nem ao longo do tempo de armazenamento. Desta forma, pode concluir-se que a incorporação do aditivo ingrediente natural, a nível de pH, é totalmente viável.

Neves et al. (2020) realizaram um estudo relativamente à viabilidade da fermentação natural (massa ácida) na elaboração de pães de forma com acréscimo de polpa de araticum (*Annona crassiflora* Mart.). Os autores constataram que o pH dos pães que foram incorporados com a polpa de araticum apresentaram maiores valores de pH comparativamente com o padrão. Os autores justificaram esta diferença pela presença dos ácidos orgânicos naturais da fruta.

Quattrini et al. (2019) com o objetivo de identificarem estratégias alternativas aos conservantes convencionais, exploraram a sinergia de ácidos orgânicos (sendo um deles o ácido sórbico) com intuito de retardar a deterioração fúngica do pão. Após as análises realizadas pelos autores, perceberam que a adição de ácido sórbico reduziu o valor de pH de $5,4 \pm 0,1$ (controle) para $5,1 \pm 0,1$.

Desta forma, os resultados obtidos com o presente estudo estão de acordo com os descritos na literatura. O extrato com ingrediente natural destaca-se por não apresentar alterações significativas nos pães, o que se apresenta como um ponto positivo.

aw. A avaliação da atividade de água foi realizada nas três amostras de pão (controle, com aditivo sintético e com ingrediente natural) durante os dois tempos de armazenamento (T0 e T3 dias). Os resultados obtidos, assim como o tratamento estatístico aplicado entre as amostras e os tempos de armazenamento, estão descritos na **Tabela 13**.

Tabela 13 - Avaliação da atividade de água das amostras de pão durante os tempos de armazenamento T0 e T3 dias.

	Controle	Aditivo sintético	Ingrediente natural
aw			
T0	0,9073±0,003 ^{a,A}	0,8793±0,004 ^{b,A}	0,9008±0,004 ^{c,a,A}
T3	0,8759±0,009 ^{a,B}	0,8368±0,004 ^{b,B}	0,8626±0,01 ^{b,a,B}

^{a-c} Os valores médios na mesma linha não seguidos por um sobrescrito comum diferem significativamente entre as amostras (Controle, Aditivo sintético e Conservante natural) pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

^{A-B} Os valores médios na mesma coluna não seguidos por um sobrescrito comum diferem significativamente ao longo do tempo de armazenamento (T0 e T3) pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os valores de atividade da água variaram entre 0,8368 e 0,9073 na amostragem de pão. Em geral, após análise estatística todas as amostras mostraram uma diminuição do valor da atividade de água com o passar do tempo. Fazendo o estudo comparativo entre as amostras dentro de cada tempo, tanto para T0 quanto para T3, o pão com aditivo sintético apresentou uma diferença significativa relativamente ao pão controle, enquanto o pão com ingrediente natural não apresentou diferença significativa comparado com o pão controle.

Após avaliação destes resultados, observou-se uma tendência de diminuição de aw em todas as amostras, como era expectável.

4.4.2 Avaliação dos parâmetros nutricionais

O perfil nutricional foi avaliado para as três amostras de pão (controle, com aditivo sintético e com ingrediente natural) em ambos os tempos de armazenamento (0 e 3 dias). Para tal, foram determinados os teores de gordura, proteína, cinzas, hidratos de carbono e energia. Os resultados obtidos, assim como o tratamento estatístico aplicado entre as amostras e os tempos de armazenamento, estão descritos na **Tabela 14**.

Em relação aos valores apresentados na tabela, foi possível observar que todas as amostras de pão apresentaram o mesmo comportamento ao decorrer do tempo de armazenamento. Os parâmetros avaliados apresentam valores muito semelhantes entre amostras dentro dos mesmos tempos de armazenamento e após 3 dias de armazenamento.

No entanto, em alguns casos, as pequenas diferenças observadas são estatisticamente significativas, o que pode ser justificado com alguma alteração no processo de confeção.

Relativamente aos dados disponíveis na literatura, não foram encontrados trabalhos que fizessem uma comparação entre pães de leite, cuja amostragem fosse de alguma forma funcionizada.

Tabela 14 – Avaliação do perfil nutricional das amostras de pão durante os tempos de armazenamento T0 e T3 dias.

	Controlo	Aditivo sintético	Conservante natural
Gordura (g/100 g)			
T0	5±0,1 ^{a,A}	5,1±0,1 ^{a,A}	4,82±0,01 ^{b,A}
T3	4,92±0,04 ^{a,A}	4,9±0,1 ^{a,A}	4,6±0,1 ^{b,A}
Proteína (g/100 g)			
T0	8,11±0,04 ^{a,A}	8,06±0,04 ^{a,b,A}	8,02±0,01 ^{b,A}
T3	8,21±0,01 ^{a,A}	8,3±0,2 ^{b,A}	8,2±0,1 ^{c,A}
Cinzas (g/100 g)			
T0	2,5±0,1 ^{a,A}	1,8±0,1 ^{b,A}	3,4±0,1 ^{c,A}
T3	2,61±0,03 ^{a,A}	2±0,03 ^{b,A}	3,6±0,2 ^{c,A}
Hidratos de carbono (g/100 g)			
T0	84,33±0,01 ^{a,A}	85±0,1 ^{b,A}	83,8±0,1 ^{c,A}
T3	84,27±0,01 ^{a,A}	84,8±0,1 ^{a,A}	83,5±0,2 ^{b,A}
Energia (Kcal)			
T0	415±0,4 ^{a,A}	418±0,04 ^{b,A}	410,4±0,3 ^{c,A}
T3	414,1±0,2 ^{a,A}	416,7±0,1 ^{a,A}	408,7±0,2 ^{b,A}

^{a-c} Os valores médios na mesma linha não seguidos por um sobrescrito comum diferem significativamente entre as amostras (Controlo, Aditivo sintético e Conservante natural) pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

^{A-B} Os valores médios na mesma coluna não seguidos por um sobrescrito comum diferem significativamente ao longo do tempo de armazenamento (T0 e T3) pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.4.3 Avaliação da carga microbiana

A avaliação da carga microbiana foi realizada através da análise da inibição do crescimento de diferentes microrganismos, nomeadamente mesófilos aeróbios totais, *bacillus cereus*, enterobactéria, bolores e leveduras. O estudo foi feito ao longo do tempo de armazenamento (T0 e T3 dias) em toda a amostragem (controlo, com aditivo sintético e com ingrediente natural). Os resultados obtidos estão apresentados em forma de gráficos com os respectivos desvios padrão na **Figura 28**.

Foi observado que, ao longo dos 3 dias de armazenamento, nas estirpes de mesófilos, ingrediente natural adicionado ao pão não foi eficaz na inibição destes microrganismos. Por outro lado, nesta amostra de pão não foi observada o crescimento

de *Bacillus cereus* no final do terceiro dia de armazenamento. O mesmo aconteceu nos bolores e nas Enterobactérias.

No entanto, estes resultados mostraram que o aditivo sintético demonstrou melhor eficácia nos microrganismos mesófilos e em *Bacillus cereus*, equanto que nas enterobactérias não houve diferenciação de nenhum dos aditivos incorporados e, por fim, nos bolores em todas as amostras se verificou a inibição da proliferação, o que pode ser justificado pela perda de aw, descrita na **secção 4.4.1**.

Apesar de o ingrediente natural não ter demonstrado a capacidade conservante pretendida no presente estudo, não significa que o extrato tenha perdido o potencial antimicrobiano comprovado anteriormente; no entanto pode ser necessária a adição de uma maior concentração de extrato para que consiga ter a eficácia do seu análogo sintético.

Por outro lado, esta ausência da capacidade conservante pode estar relacionada com a degradação dos compostos conservantes aquando do cozimento do produto alimentar. Isto porque, como foi incorporado na forma livre torna-se mais instável e susceptível a todos os fenómenos externos. Para comprovar esta possibilidade serão feitos estudos de microencapsulação do extrato para posterior incorporação.

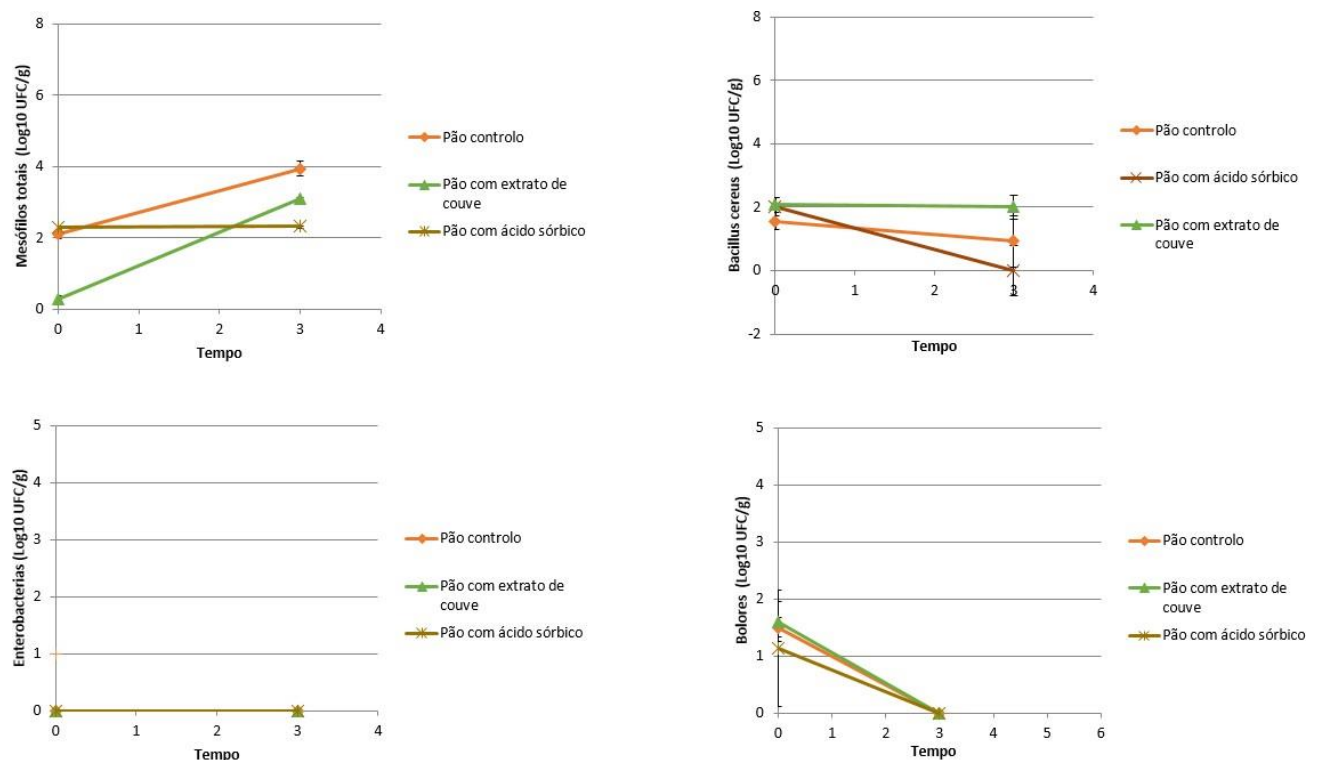


Figura 28 – Gráficos do crescimento microbiano

4.5 Considerações finais e perspectivas futuras

A presente dissertação levou a cabo um estudo exaustivo de biorresíduos de couve galega (*Brassica oleracea* var. *Acephala.*), quanto à sua caracterização nutricional e química. Para além disso, as propriedades bioativas do extrato rico em fenóis e flavonóides, obtido a partir dos biorresíduos da couve galega foram determinadas e os resultados foram reveladores. O extrato correspondeu às expectativas, sendo uma boa fonte de fenóis e flavonóides totais e apresentando atividade antioxidante. Além disso, mostrou-se um bom antimicrobiano frente a todas as estirpes de bactérias e fungos testadas, destacando-se inclusive por possuir melhores atividade do que os conservantes E211 e E224 nas estirpes *Bacillus cereus* e *Enterobacter cloacae*.

Relativamente à incorporação, a nível dos parâmetros físicos as análises comparativas indicaram a possível necessidade de um reajuste da concentração do extrato utilizada, no sentido de igualar o produto funcionalizado com o produto original. A nível nutricional também se verificaram algumas alterações favorecendo o pão de leite funcionalizado, pois este apresentou um teor em minerais mais elevado. Por outro lado, a nível microbiano, foram feitas comparações estatísticas para chegar a uma resposta. Sabe-se que os microrganismos dependem de condições favoráveis para sua multiplicação, sendo que as características do alimento possuem grande influência no desenvolvimento microbiano. Dentre estas características, estão incluídos os valores de a_w e pH, devidamente avaliados no presente estudo. Uma vez que o pão controlo apresenta uma faixa de pH e valores de a_w ótimos para o desenvolvimento de grande parte dos microrganismos, foi possível observar as alterações durante o tempo de armazenamento de 3 dias. Nesse sentido, a incorporação do extrato foi feita com o intuito de retardar o crescimento microbiano, uma vez que se estaria a aplicar um inibidor natural (agente antioxidante e antimicrobiano, comprovado através das análises anteriores). A utilização do extrato de couve apresenta-se como uma alternativa conservante, visto que inibiu, mesmo que pouco, o crescimento dos microrganismos mesófilos. É válido considerar que o extrato isolado apresentou boa atividade bactericida para *Bacillus cereus* e quando analisado incorporado foi o que apresentou piores resultados, porém, a concentração de CMB provavelmente foi superior à incorporada.

Apesar deste resultado, o extrato não pode ser considerado um fraco conservante natural, mas sim, em estudos posteriores, terá de ser ajustada a quantidade a ser incorporada no produto alimentar, para verificar se aumenta a eficácia conservante.

Desta forma, e tendo em conta todos os resultados obtidos, o presente trabalho de investigação demonstrou o potencial nutricional e bioativo dos biorresíduos de couve galega, atribuindo-lhe valor agregado. Pode, também, constatar-se que esta matriz pode resultar num produto de grande interesse nutritivo, tecnológico e económico, além de ser isento de químicos e toxicidade.

Relativamente às perspetivas futuras, irão ser feitos mais testes de incorporação para avaliar o poder conservante do extrato em maiores concentrações e noutros produtos alimentares. Para além disso, recorrer-se-á a metodologias de encapsulação do extrato com objetivo de melhorar sua estabilidade. Além disso, realizar-se-á, também, a comparação do comportamento entre o extrato ativo encapsulado e sua forma livre na incorporação e na biodisponibilidade dentro do organismo humano, através de ensaios *in vitro*.

5 Referências bibliográficas

A

- Acikgoz, F. E. (2011). Mineral, vitamin C and crude protein contents in kale (*Brassica oleraceae* var. *acephala*) at different harvesting stages. *African Journal of Biotechnology*, 10(75), 17170–17174.
- Agência Portuguesa do Ambiente. (2019). Estudo prévio sobre a implementação da recolha seletiva em Portugal Continental incidindo em especial sobre o fluxo dos biorresíduos Relatório final Agência Portuguesa do Ambiente.
- Agência Portuguesa do Ambiente. (2021). Relatório Anual de Resíduos Urbanos 2020.
- Allen, A. (2018). *Economia Linear, Economia Circular e Blockchain*. <http://www.acriacao.com/economia-linear-economia-circular-e-blockchain/>
- AOAC. (2016). *Official Methods of Analysis*, 20th. In AOAC International.
- Araújo, F. F. de, Farias, D. de P., Neri-Numa, I. A., & Pastore, G. M. (2021). Polyphenols and their applications: An approach in food chemistry and innovation potential. *Food Chemistry*, 338, 127535.
- Arias, J. L. de O. (2019). Determinação de conservantes em alimentos processados empregando QuEChERS, SILLME E HPLC-UV: estudo de métodos e estimativa da ingestão diária [Tese de doutoramento, Universidade Federal do Rio Grande].
- Ayaz, Faik A., Glew, R. H., Millson, M., Huang, H. S., Chuang, L. T., Sanz, C., & Hayirlioglu-Ayaz, S. (2006). Nutrient contents of kale (*Brassica oleraceae* L. var. *acephala* DC.). *Food Chemistry*, 96(4), 572–579.
- Ayaz, Faik Ahmet, Hayirlioglu-Ayaz, S., Alpay-Karaoglu, S., Grúz, J., Valentová, K., Ulrichová, J., & Strnad, M. (2008). Phenolic acid contents of kale (*Brassica oleraceae* L. var. *acephala* DC.) extracts and their antioxidant and antibacterial activities. *Food Chemistry*, 107(1), 19–25.
- Aydin, S. (2020). Total phenolic content, antioxidant, antibacterial and antifungal activities, FT-IR analyses of *Brassica oleracea* L. var. *acephala* and *Ornithogalum umbellatum* L. *Genetika*, 52(1), 229–244.

B

- Baeta, M. I. G. (2014). Subprodutos da indústria de hortofrutícolas minimamente processados: caracterização e valorização do potencial bioativo e energético [Dissertação de mestrado, Universidade de Lisboa].
- Baptista et al. (2021). Three in One: The Potential of Brassica By-Products against Economic Waste, Environmental Hazard, and Metabolic Disruption in Obesity. *Nutrients*, 13(12), 4194.
- Barros, L., Oliveira, S., Carvalho, A. M., & Ferreira, I. C. F. R. (2010). In vitro antioxidant properties and characterization in nutrients and phytochemicals of six medicinal plants from the Portuguese folk medicine. *Industrial Crops and Products*, 32(3), 572–579.

- Barros, L., Pereira, E., Calhelha, R. C., Dueñas, M., Carvalho, A. M., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2013a). Bioactivity and chemical characterization in hydrophilic and lipophilic compounds of *Chenopodium ambrosioides* L. *Journal of Functional Foods*, 5(4), 1732–1740.
- Barros, L., Pereira, E., Calhelha, R. C., Dueñas, M., Carvalho, A. M., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2013b). Bioactivity and chemical characterization in hydrophilic and lipophilic compounds of *Chenopodium ambrosioides* L. *Journal of Functional Foods*, 5(4), 1732–1740.
- Bhandari, S. R., & Kwak, J. H. (2015). Chemical composition and antioxidant activity in different tissues of brassica vegetables. *Molecules*, 20(1), 1228–1243.

C

- Cacciola, F., Beccaria, M., Oteri, M., Utczas, M., Giuffrida, D., Cicero, N., Dugo, G., Dugo, P., & Mondello, L. (2016). Chemical characterisation of old cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) seed oil by liquid chromatography and different spectroscopic detection systems. *Natural Product Research*, 30(14), 1646–1654.
- Caldeira, C., De Laurentiis, V., Corrado, S., van Holsteijn, F., & Sala, S. (2019). Quantification of food waste per product group along the food supply chain in the European Union: a mass flow analysis. *Resources, Conservation and Recycling*, 149(August 2018), 479–488.
- Caleja, C., Barros, L., Antonio, A. L., Oliveira, M. B. P. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2017). A comparative study between natural and synthetic antioxidants: Evaluation of their performance after incorporation into biscuits. *Food Chemistry*, 216, 342–346.
- Cardoso, O., Antônio, C., & Berni, F. (2017). Consórcio couve-de-folha (*Brassica oleracea* var. *acephala*) e cariru (*Talinum triangulare*) sob duas alternativas de fertilização em cultivo protegido. *Horticultura Argentina*, 36(91), 96–109.
- Carocho, M., Morales, P., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). Natural food additives: Quo vadis? *Trends in Food Science and Technology*, 45, 284–295.
- Costa Filho, D. V. et al. (2017). Aproveitamento de resíduos agroindustriais na elaboração de subprodutos. II Congresso Internacional Das Ciências Agrárias COINTER - PDVAgro, 8.

D

- Decreto-Lei n.º 102-D/2020 de 10 de dezembro do Ministério do Ambiente e da Ação Climática, Pub. L. No. Diário da república: série I, 2 (2020).
- DGAV (2022). Aditivos alimentares. <https://www.dgav.pt/alimentos/conteudo/generos-alimenticios/garantir-a-seguranca-dos-alimentos/aditivos-enzimas-e-aromas/aditivos-alimentares/>
- Dian, P. H. M., Joppert, P. E. R., Kozusny-Andreani, D. I., Soares, V. E., Belo, M. A. A., Melo, G. M. P. & Pacheco, M. D. (2020). Atividade antimicrobiana de ácidos orgânicos com e sem extrato vegetal no controle in vitro de *Escherichia coli* E *Salmonella Typhi*. *Ars Veterinaria*, 36(4), 236–241.

Drabińska, N., Ciska, E., Szmatowicz, B., & Krupa-Kozak, U. (2018). Broccoli by-products improve the nutraceutical potential of gluten-free mini sponge cakes. *Food Chemistry*, 267(2018), 170–177.

E

EC N° 98/2018. (2018). CE - Comissão Europeia (2018) Regulamento (UE) n.º 2018/98 da Comissão, de 22 de janeiro de 2018, que altera os anexos II e III do Regulamento (CE) n.º 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho e o anexo do regulamento da Comissão (UE) n.º 231/2012 n, v. 17(2018).

Em, T., & Panificação, P. D. E. (2012). *Incorporação E Optimização De Aditivos Alimentares E Auxiliares*.

F

European Commission Joint Research Centre. (2020). Brief on food waste in the European Union. <https://www.eu-fusions.org/>

FAO. (2020). Fruit and vegetables – your dietary essentials. In *The International Year of Fruits and Vegetables*, background paper, Roma.

FAO (2020) Online statistical database. In: FAOSTAT . <http://faostat.fao.org>

Favela-González, K. M., Hernández-Almanza, A. Y., & De la Fuente-Salcido, N. M. (2020). The value of bioactive compounds of cruciferous vegetables (Brassica) as antimicrobials and antioxidants: A review. *Journal of Food Biochemistry*, 44(10).

Fuente, B. D. La, López-García, G., Máñez, V., Alegría, A., Barberá, R., & Cilla, A. (2020). Antiproliferative effect of bioaccessible fractions of four brassicaceae microgreens on human colon cancer cells linked to their phytochemical composition. *Antioxidants*, 9(5), 368.

G

Galanakis, C. M. (2012). Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends in Food Science and Technology*, 26, 68–87.

Galo, G. T., Lima, A. C. D. S., Machado, K. M., Vieira, L. B., Martins, V. C., Ferreira, N. L., & Lucarini, A. C. (2018). Estudo da extração da quercetina a partir da cebola roxa (*Allium cepa* L.) e seu uso como conservante alimentar natural. *The Journal of Engineering and Exact Sciences*, 4(1), 153–162.

Gaspar, L. M. R., Inácio, C. de T., Quintaes, B. R., Carvalho, L. de S. Q., & Peres, A. A. de C. (2020). Economic and financial analysis of the management of organic solid waste from a small-scale agro-processing industry. *Engenharia Sanitaria e Ambiental*, 25(3), 477–488.

Gorni, P. H., Pacheco, A. C., Silva, J. F. A., Moreli, R. R., Spera, K. D., & Silva, R. M. G. (2019). Plant elicitation with salicylic acid increases bioactive compounds content and antioxidant activity in the infusion of *Achillea millefolium* L. *Bioscience Journal*, 35(1), 289–295.

H

Humana Portugal. (2019). Jornada técnica sobre a economia circular. Sintra, 7.
http://m.smartwasteportugal.com/fotos/editor2/jornada_economia_circular_programa_provisorio.pdf

J

Jabeur, I., Tobaldini, F., Martins, N., Barros, L., Martins, I., Calhelha, R. C., Henriques, M., Silva, S., Achour, L., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2016). Bioactive properties and functional constituents of *Hypericum androsaemum* L.: A focus on the phenolic profile. *Food Research International*, 89, 422–431.

Jesus, C., & Pires, I. (2018). “Fechar o ciclo”. A contribuição da economia circular para o combate ao desperdício alimentar. *Revista Ecologias Humanas*, 4(4), 7–20.

Júnior, S. V. (2020). Aproveitamento de resíduos agroindustriais - Uma abordagem sustentável. *Embrapa Agroenergia*, 26.

K

Kövilein, A., Kubisch, C., Cai, L., & Ochsenreither, K. (2020). Malic acid production from renewables: a review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 95(3), 513–526.

L

Lafarga et al. (2018). Effect of steaming and sous vide processing on the total phenolic content, vitamin C and antioxidant potential of the genus *Brassica*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 4, 412–420.

Le, T. N., Chiu, C.-H., & Hsieh, P.-C. (2020). Bioactive Compounds and Bioactivities of *Brassica oleracea* L. var. *Italica* Sprouts and Microgreens: An Updated Overview from a Nutraceutical Perspective. *Plants*, 9(8), 946.

Lopes, M. F. (2015). Compostos bioativos e capacidade antioxidante em blends em pó de frutas e hortaliças obtidos por atomização. [Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Campina Grande].

M

Pereira, M. . B. P.. (2015). Avaliação da capacidade antioxidante e antimicrobiana de infusões de subprodutos de couve-flor (*Brassica oleracea* var . *Botrytis*) obtidas por Altas Pressões Hidrostáticas. [Dissertação de mestrado, Universidade do Porto].

Martillanes, S., Rocha-Pimienta, J., Cabrera-Bañegil, M., Martín-Vertedor, D., & Delgado-Adámez, J. (2017). Application of Phenolic Compounds for Food Preservation: Food Additive and Active Packaging. *Phenolic Compounds - Biological Activity*.

Ministério do Ambiente e da ação climática. (2020). Biorresíduos: Contas certas nos resíduos. <https://eco.nomia.pt/contents/documentacao/2020-orientacoes-biorresiduos-v1.pdf>

Morseletto, P. (2020). Targets for a circular economy. *Resources, Conservation and Recycling*, 153(October 2018), 104553.

N

Neugart et al. (2018). Effect of solid biological waste compost on the metabolite profile of *Brassica rapa* ssp. *chinensis*. *Frontiers in Plant Science*, 9(305), 1–13.

Neves, N. de A., Gomes, P. T. G., & Schmiele, M. (2020). Estudo exploratório sobre a elaboração e avaliação de pães de forma com fermentação natural e adição de polpa de araticum (*Annona crassiflora* Mart.). *Research, Society and Development*, 9(9), e956998036.

P

Patras, A. (2019). Stability and colour evaluation of red cabbage waste hydroethanolic extract in presence of different food additives or ingredients. *Food Chemistry*, 275(2019), 539–548.

Pereira, E., Barros, L., Martins, A., & Ferreira, I. C. F. R. (2012). Towards chemical and nutritional inventory of Portuguese wild edible mushrooms in different habitats. *Food Chemistry*, 130(2), 394–403.

Pierozan, M. B., Costa, A. C., Silva, M. A. P. da, Cappato, L. P., Medeiros, R. M. dos S. de, Rezende, I. R. de, Fernandes, M. P., & Botelho, H. A. (2021). Uso de ácidos orgânicos para descontaminação de carnes. *Food Safety Brazil*.

Pintado, M. E., & Teixeira, J. A. (2015). Valorização dos subprodutos da indústria alimentar: Obtenção De Ingredientes De Valor Acrescentado. *Boletim de Biotecnologia*, 10–12.

Portaria nº 540, de 27 de outubro de 1997. *Diário Oficial da União; Poder Executivo*, de 28 de outubro de 1997., (1997).

Programa das Nações Unidas para o Ambiente. (2021). *Food Waste Index Report 2021*.

Q

Quattrini, M., Liang, N., Fortina, M. G., Xiang, S., Curtis, J. M., & Gänzle, M. (2019). Exploiting synergies of sourdough and antifungal organic acids to delay fungal spoilage of bread. *International Journal of Food Microbiology*, 302(September 2018), 8–14.

R

Raiola et al. (2018). Bioactive Compounds in Brassicaceae Vegetables with a Role in the Prevention of Chronic Diseases. *Molecules*, 23(15), 10.

Raphael, W., Machado, C., Filippin, A. P., Mendes Da Silva, L., Duarte, H., Silva, M., Milani, R., & Hoffmann, M. (2021). Incorporação de compostos fenólicos em produtos alimentícios: uma revisão. *Brazilian Journal of Development*, 7(5), 46470–46499.

- Ribeiro, F. de M., & Kruglianskas, I. (2014). A Economia Circular no contexto europeu: conceito e potenciais de contribuição na modernização das políticas de resíduos sólidos. XVI ENGEMA - Encontro Internacional Sobre Gestão Empresarial e Meio Ambiente, 16.
- Ribotta, P. D., Pérez, G. T., Añón, M. C., & León, A. E. (2010). Optimization of additive combination for improved soy-wheat bread quality. *Food and Bioprocess Technology*, 3(3), 395–405.
- Rocha, L. S., & Cardoso Santiago, R. de A. (2009). Implicações nutricionais e sensoriais da polpa e casca de baru (*Dipterix Alata* vog.) na elaboração de pães. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 29(4), 820–825.
- Rocha, W. S., Lopes, R. M., da Silva, D. B., Vieira, R. F., da Silva, J. P., & Agostini-Costa, T. da S. (2011). Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 33(4), 1215–1221.
- Rodrigues et al. (2021). Evaluation of the properties of the canola cake in automated extruder press extraction process by varying temperature and rotation. *Research, Society and Development*, 10(16).

S

- Sagar et al. (2018). Fruit and Vegetable Waste: Bioactive Compounds, Their Extraction, and Possible Utilization. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(3), 512–531.
- Salvino, É. M. (2014). Avaliação química e nutricional de couve (*Brassica oleraceae* var. *acephala*) desidratada e aplicação em formulações de pão de forma. [Tese de doutoramento, Universidade Federal da Paraíba, Brasil].
- Šamec, D., Urlič, B., & Salopek-Sondi, B. (2018). Kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) as a superfood: Review of the scientific evidence behind the statement. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(15), 2411–2422.
- Sánchez-Mata, M. C., & Tardío, J. (2016). Mediterranean wild edible plants. In *Ethnobotany and Food Composition Tables*, 273–470.
- Santana Silva, E. DE, Melo Soares, F., & Rodrigues Barros, J. DE. (2019). Conservação De Alimentos Pelo Uso De Aditivos: Uma Revisão. 37(2), 10–20.
- Sigrist, S. (2015). Couve, couve-manteiga. Portal de Plantas Medicinais. <https://www.ppmac.org/content/couve-couve-manteiga>
- Silva, A. S. L. da, Silva, A. de J., Latif, A. L. O., Santos Júnior, A. de F., & Benevides, C. M. de J. (2022). Uso de metodologias analíticas para determinação de compostos fenólicos em alimentos no Brasil: avanços e fragilidades. *Research, Society and Development*, 11(2), e1311225193.
- Silva, J. A. da. (2018). Identificação de compostos fenólicos, macroantioxidantes e avaliação da atividade antioxidante do bagaço de uva proveniente da indústria de sucos no vale do São Francisco. [Dissertação de mestrado, Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira].

Spagnol, W. A., Silveira Junior, V., Pereira, E., & Guimarães Filho, N. (2018). Redução de perdas nas cadeias de frutas e hortaliças pela análise da vida útil dinâmica. *Brazilian Journal of Food Technology*, 21(e2016070).

T

Thomas, M., Badr, A., Desjardins, Y., Gosselin, A., & Angers, P. (2018). Characterization of industrial broccoli discards (*Brassica oleracea* var. *italica*) for their glucosinolate, polyphenol and flavonoid contents using UPLC MS/MS and spectrophotometric methods. *Food Chemistry*, 245, 1204–1211.

V

Vale, A. P., Santos, J., Brito, N. V., Peixoto, V., Carvalho, R., Rosa, E., & Oliveira, M. B. P. P. (2015). Light influence in the nutritional composition of *Brassica oleracea* sprouts. *Food Chemistry*, 178, 292–300.

Vale, A. P., Santos, J., Melia, N., Peixoto, V., Brito, N. V., & Oliveira, M. B. P. P. (2015). Phytochemical composition and antimicrobial properties of four varieties of *Brassica oleracea* sprouts. *Food Control*, 55, 248–256.

Vidal, N. P., Pham, H. T., Manful, C., Pumphrey, R., Nadeem, M., Cheema, M., Galagedara, L., Leke-Aladekoba, A., Abbey, Lord, & Thomas, R. (2018). The use of natural media amendments to produce kale enhanced with functional lipids in controlled environment production system. In *Scientific Reports*, 8(14771).

Vincenzi, D., Mendes, L. D. J., & Mota, V. M. (2021). Aditivos como conservantes químicos. *Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação*, 7(9), 821–849.

W

Waghulde, S., Khan, N. A., Gorde, N., Kale, M., Naik, P., & Yewale, R. P. (2019). Comparative Antimicrobial Activity Study of *Brassica oleracea*. *Proceedings*, 9(1), 64.

Wolfe, K. L., & Rui, H. L. (2007). Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(22), 8896–8907.

Wolfe, K., Wu, X., & Liu, R. H. (2003). Antioxidant activity of apple peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(3), 609–614.

Z

Zardo, D. M. (2019). Compostos fenólicos de maçãs comerciais, polinizadoras e silvestres como agentes antibacterianos e antioxidantes em alimentos [Tese de doutoramento, Universidade Estadual de Ponta Grossa].

Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. In *Food Chemistry* 64(4), 555–559.