

LUANA CRISTINA RODRIGUES DA SILVA

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DE EXTRATO AQUOSO DE COUVE E POTENCIAL SUPLEMENTAÇÃO EM BEBIDA LÁCTEA FERMENTADA

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Produção Animal do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Produção Animal.

Área de concentração: Produção animal

Orientador: Alcinei Místico Azevedo

Coorientadoras: Anna Christina de Almeida
Francine Souza Alves da Fonseca

MONTES CLAROS

2018

LUANA CRISTINA RODRIGUES DA SILVA

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DE EXTRATO AQUOSO DE
COUVE E POTENCIAL SUPLEMENTAÇÃO EM BEBIDA LÁCTEA FERMENTADA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Produção Animal do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Produção Animal.

Área de concentração: Produção animal

Linha de pesquisa: Qualidade de produtos de origem animal

Orientador: Alcinei Místico Azevedo
Instituto de Ciências Agrárias

Aprovado pela banca examinadora constituída pelos professores:

Prof.^a Anna Christina de Almeida

ICA-UFMG

Prof. Igor Vianna Brandi

ICA-UFMG

Prof. César Fernandes Aquino

UFOB

Prof. Alcinei Místico Azevedo

ICA-UFMG

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Minas Gerais e ao Programa de Pós-graduação em Produção Animal pela oportunidade de realização do mestrado.

À minha família pelo incentivo e por acreditarem em mim, em especial, minha mãe, irmãs e avós.

Ao meu orientador Alcinei, pela orientação, apoio, incentivo e confiança.

Às minhas coorientadoras Anna Christina e Francine pelas contribuições, incentivo, amizade e por me auxiliarem em momentos de dúvidas.

Ao Professor Igor por vincular a dissertação ao Projeto (ProExt 2015 MEC/SESu - Desenvolvimento de alimento para combate à fome e à sub nutrição infantil) possibilitando a execução da pesquisa.

Ao Professor Ernane por disponibilizar as instalações do laboratório de Plantas Medicinais para execução das análises.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Davy por estar sempre ao meu lado, me ajudando, apoiando e incentivando.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização e evolução desta pesquisa.

Aos professores da banca examinadora pela atenção e contribuição neste trabalho.

E a Deus por tudo!

RESUMO

Devido às características da couve e a conscientização dos consumidores por produtos benéficos à saúde, objetivou-se avaliar o potencial antioxidante e antimicrobiano de extrato aquoso de couve e verificar a viabilidade de sua adição em bebida láctea fermentada. As folhas foram submetidas a quatro tratamentos: frescas trituradas em liquidificador, frescas pulverizadas em nitrogênio líquido, secagem em estufa por 72 h (45°C) e congelamento (-20°C), em seguida preparou-se os extratos aquosos na concentração de 0,1 g mL⁻¹. Avaliou-se a atividade antioxidante com radical DPPH e determinou-se EC₅₀ dos tratamentos. Foram determinadas a concentração de compostos fenólicos totais e flavonoides. A atividade antimicrobiana foi analisada pelo método de difusão em placas com discos de papel frente as bactérias: *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Escherichia coli* ATCC 8759 e *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708. Para a adição na bebida escolheu-se o tratamento que apresentou resultados satisfatórios nas análises de atividade antioxidante, determinação de fenólicos e flavonoides em função do extrato. Preparou-se a bebida láctea fermentada adicionada do extrato de couve de folhas secas nas concentrações de 5%, 10%, 15%, 15% com sorbato e o controle (sorbato de potássio a 3,0%). A análise antioxidante da bebida também foi feita utilizando-se o radical DPPH. Em todas as bebidas produzidas foram feitas as contagens de bactérias lácticas. O delineamento foi inteiramente casualizado e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de significância. As folhas recém-colhidas submetidas às técnicas de trituração (63,16%) e pulverização (62,04%) não se diferiram estatisticamente. Já as folhas secas (78,75%) e congeladas (71,20%) apresentaram os maiores valores de atividade antioxidante. As folhas secas e as congeladas apresentaram valores de EC₅₀, respectivamente, 10 e 43,8 mg mL⁻¹ e as folhas frescas pulverizadas e frescas trituradas apresentaram maiores valores de EC₅₀ (61,77 e 76,15 mg mL⁻¹), portanto quanto menor a EC₅₀ maior é a atividade antioxidante. As folhas secas, congeladas e frescas pulverizadas não diferiram estatisticamente quanto aos compostos fenólicos apresentando valores médios de 43,53; 42,94; 40,22 mg EAG/g peso seco, respectivamente. Já as folhas frescas trituradas apresentaram menor teor de fenólicos, com média de 29,89 mg EAG/g peso seco, mas não se diferiram das frescas pulverizadas. As folhas secas, congeladas e frescas trituradas não se diferiram estatisticamente quanto aos flavonoides, com valores médios de 14,59; 11,53; 9,22 mg EQ/g peso seco, respectivamente. E as folhas frescas pulverizadas apresentaram o maior teor de flavonoides (26,83 mg EQ/g peso seco). Nesse experimento, os extratos aquosos de couve não apresentaram atividade antibacteriana frente aos microrganismos estudados. A bebida láctea com 15% de extrato e a bebida com 15% com sorbato não diferiram estatisticamente e apresentaram maior atividade antioxidante. A bebida láctea fermentada já possui o potencial antioxidante e a adição de 15% do extrato aquoso de folha de couve seca aumentou mais de três vezes este potencial. Quanto à contagem de bactérias lácticas, todas as bebidas preparadas atenderam a legislação vigente com valores superiores a 10⁶ UFC mL⁻¹. Portanto, o extrato aquoso de couve é promissor para adição em bebida láctea fermentada, pois apresenta alta atividade antioxidante, compostos fenólicos e flavonoides, pode inibir a oxidação da bebida e é de fácil manipulação por utilizar água como solvente.

Palavras-chave: *Brassica oleracea* var. *acephala*; fenólicos; flavonoides; extrato aquoso; DPPH.

ABSTRACT

Due to the characteristics of the kale and the consumer's awareness of beneficial health products, the objective was to evaluate the antioxidant and antimicrobial potential of aqueous kale extract and verify the viability of its addition in fermented dairy beverages. The leaves were submitted to four treatments: fresh crushed in a blender, fresh pulverized with liquid nitrogen, oven drying for 72 h (45°C) and freezing (-20°C). The aqueous extracts were prepared in a concentration of 0.1 g mL⁻¹. The antioxidant activity with DPPH radical was evaluated and EC 50 of the treatments were determined. To the concentration of total phenolic compounds and flavonoids of all treatments. The antimicrobial activity was analyzed by the method of plate diffusion in paper discs against the bacteria: *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Escherichia coli* ATCC 8759 e *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708. For the addition in the beverage the treatment was chosen that presented satisfactory results in the analyzes of antioxidant activity, determination of phenolics and flavonoids as a function of the extract. The fermented lactic drink was prepared adding concentrations of 5%, 10%, 15%, 15% with sorbate and control (potassium sorbate) of dried kale leaf extract. The antioxidant activity of the beverage was also made using the method of DPPH radical. The number of lactic bacteria in all beverages were calculated. The statistical design of the experiment was completely randomized and the averages were compared by Tukey test at 5% significance. The fresh leaves crushed in a blender (63.16%) and fresh pulverized (62.04%) The fresh leaves crushed in a blender (63.16%) and fresh pulverized (62.04%) were not statistically different. Dry leaves (78.75%) and frozen (71.20%) had the highest values of antioxidant activity. The dry and frozen leaves had EC50 values, respectively, 10 and 43.8 mg mL⁻¹, and the fresh and crushed fresh leaves had higher values of EC50 (61.77 and 76.15 mg mL⁻¹), therefore the lower the EC50 the higher the antioxidant activity. The dried, frozen and fresh leaves pulverized did not differ statistically as for the phenolic compounds presenting average values of 43.53; 42.94; 40.22 mg EAG / g dry weight, respectively. The fresh crushed leaves had a lower phenolic content, with a mean of 29.89 mg EAG / g dry weight, but did not differ from fresh ones. Dry, frozen and fresh crushed leaves were not statistically different from flavonoids, with a mean value of 14.59; 11.53; 9.22 mg EQ / g dry weight, respectively. And the fresh leaves pulverized had the highest content of flavonoids (26.83 mg EQ / g dry weight). The aqueous extracts of kale leaves did not present antibacterial activity against the microorganisms studied. The fermented lactic drink with 15% of extract and the one with 15% with sorbate did not differ statistically and presented greater antioxidant activity. The fermented lactic beverage already possesses the antioxidant potential and a 15% addition of aqueous extract of dried kale leaf increased in three times more this potential. Regarding lactic acid counts, all prepared beverages complied with current legislation with values greater than 10⁶ UFC mL⁻¹. Therefore, the aqueous extract of kale leaf showed promising benefits to be added in fermented lactic beverages, because it increases its antioxidant activity, phenolic compounds and flavonoids. Besides being an easy extract to handle by using water as the solvent and inhibit the oxidation of the beverage.

Keywords: *Brassica oleracea* var. *acephala*; phenolic; flavonoids; aqueous extract; DPPH.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atividade antioxidante dos vegetais <i>Brassica oleracea</i> em diferentes métodos de análise.....	09
Tabela 2 - Vegetais e subprodutos de <i>Brassica oleracea</i> com ação antimicrobiana.....	13
Tabela 3 - Composição nutricional de bebida láctea fermentada (50% de leite e 50% de soro de leite) e de couve manteiga ambos em porção de 100 gramas..	16
ARTIGO	
Tabela 1 - Atividade antioxidante, EC50, teor de compostos fenólicos totais e flavonoides totais em extrato aquoso de couve.....	29
Tabela 2 – Atividade antioxidante e contagem de bactérias lácticas das bebidas lácteas fermentadas com adição de extrato aquoso de couve e do controle.....	36

SUMÁRIO

1. Introdução	7
2. Objetivos	7
2.1 Objetivo geral	7
2.2 Objetivos específicos	7
3. Revisão de literatura	8
3.1 Propriedades antioxidantes da couve e importância fitoterápica dos constituintes ..	8
3.2 Propriedades antimicrobianas de <i>Brassica oleracea</i> var. <i>acephala</i>	10
3.3 Bebida láctea fermentada como alimento funcional e utilização de <i>Brassica oleracea</i> em produtos alimentícios.....	14
ARTIGO:	22
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DE EXTRATO AQUOSO DE COUVE E POTENCIAL SUPLEMENTAÇÃO EM BEBIDA LÁCTEA FERMENTADA	22
Abstract	22
INTRODUÇÃO	23
MATERIAL E MÉTODOS	24
Coleta e preparo das amostras	24
Preparo dos extratos.....	25
Análise de atividade antioxidante.....	25
Determinação de compostos fenólicos	26
Determinação de flavonoides.....	26
Triagem da atividade antibacteriana	27
Produção da bebida láctea fermentada com extrato de couve.....	27
Análise da atividade antioxidante da bebida láctea fermentada	28
Contagem de bactérias lácticas da bebida láctea fermentada	28
Análise estatística.....	28
RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
Atividade antioxidante, compostos fenólicos e flavonoides	29
Atividade antimicrobiana dos extratos de couve	34
Bebida láctea fermentada adicionada de extrato aquoso de couve.....	35
CONSIDERAÇÕES FINAIS	37

1. Introdução

Os vegetais da espécie *Brassica oleracea* são amplamente consumidos em todo o mundo (GIRGIN; EL, 2015). Nas diversas regiões do Brasil esses vegetais são utilizados com uso tanto alimentar como medicinal (MESSIAS *et al.*, 2015; SOUZA *et al.*, 2015).

Devido ao elevado potencial nutritivo, a couve (*Brassica oleracea* var. *acephala*) está entre os vegetais classificados como “super alimentos”, principalmente pelos altos conteúdos de carotenoides, vitaminas C e K, compostos fenólicos e ácidos orgânicos (SIKORA *et al.*, 2008; NULL; FELDMAN, 2011), que conferem propriedades antioxidante e antimicrobiana (AYAZ *et al.*, 2008; KORUS, 2011; SOENGAS *et al.*, 2012; KAULMANN *et al.*, 2014) e algumas propriedades fitoterápicas, como ação sobre úlceras gástricas (AGBAJE; OKPARA, 2013).

As propriedades antioxidantes, fitoterápicas e antimicrobianas fazem com que esse vegetal seja objeto de pesquisas, uma vez que o mercado de alimentos funcionais vem crescendo nos últimos anos. Aumentando também a necessidade de se estudar as fontes de compostos bioativos e a recuperação destes compostos visando à aplicação na indústria de alimentos (BENEDETTI, 2014).

Contudo, apesar da couve ser boa fonte de antioxidantes, apresenta variações desta característica em função de seu processamento (SIKORA *et al.*, 2008; GIRGIN; EL, 2012; MURADOR *et al.*, 2016; RIGUEIRA *et al.*, 2016), com isso, é necessário determinar as melhores condições para a extração dos compostos desse vegetal.

Uma vez que os consumidores buscam cada vez mais por alimentos de alta praticidade e que traga, além de saciedade, algum benefício ao organismo. A bebida láctea é um exemplo de alimento de alta praticidade e que pode ser tornar mais funcional, pois um de seus ingredientes é o soro de leite que, apesar de ser um subproduto da indústria de laticínios, é rico nutricionalmente e apresenta proteínas de alto teor de aminoácidos essenciais com propriedades multifuncionais (SGARBIERI, 2004).

Portanto, devido à couve ser de fácil acesso as populações, ser altamente nutritiva e com propriedades funcionais, vê-se a necessidade de estudar seus compostos e suplementação em outros produtos com seus compostos bioativos, como a bebida láctea fermentada que é um alimento de fácil aceitação para todas as faixas etárias.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial antioxidante e antimicrobiano de extrato aquoso de couve *Brassica oleracea* var. *acephala* e verificar a viabilidade de sua adição em bebida láctea fermentada.

2.2 Objetivos específicos

- Estabelecer protocolo de análise para extração de compostos antioxidantes do extrato aquoso da couve;
- Determinar os compostos bioativos: fenólicos e flavonoides no extrato aquoso da couve;
- Analisar *in vitro* a atividade antimicrobiana do extrato aquoso da couve sobre bactérias patogênicas: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella* spp.;

- Verificar a viabilidade da adição do extrato aquoso de couve em diferentes concentrações em bebida láctea fermentada.

3. Revisão de literatura

3.1 Propriedades antioxidantes da couve e importância fitoterápica dos constituintes

Os antioxidantes são compostos químicos que reagem com os radicais livres para prevenir ou diminuir os danos oxidativos de lipídeos, proteínas e ácidos nucléicos causados por espécies de oxigênio ou nitrogênio livres, restringindo assim os efeitos maléficos ao organismo (COUTO; CANNIATTI-BRAZACA, 2010). É crescente a busca por compostos antioxidantes, visto que os consumidores estão mais informados das suas potencialidades, que vão desde a prevenção do envelhecimento até inibição de células cancerígenas (WANG; ZHANG, 2012; VASCONCELLOS *et al.*, 2015). Os vegetais da espécie *Brassica oleracea* tem sido bastante pesquisados quanto suas propriedades antioxidantes e os resultados são favoráveis.

A atividade antioxidante de variedades de *Brassica oleracea* determinada através dos três métodos de análises está apresentada na tabela 1, no qual avaliam a captura de determinado radical livre pelos antioxidantes da amostra. Verifica-se que a couve está entre os vegetais com maior capacidade antioxidante nos diferentes métodos, o que evidencia sua funcionalidade e a torna potencial para estudos com vista na adição em produtos alimentícios como forma de enriquecimento. Entretanto, as variedades repolho e couve-flor estão entre os de menor capacidade antioxidante.

Tabela 1 – Atividade antioxidante dos vegetais *Brassica oleracea* em diferentes métodos de análise

Vegetal	Métodos de análise			Referência
	ABTS ^a	DPPH ^b	FRAP ^c	
Brócolis	26,2 ± 1,37* µM trolox/g bs	3,72 µM trolox/g bs	7,53 µM trolox/g bs	Sikora <i>et al.</i> (2008)
	2,68 ± 0,29 mg aa/g bu			5,83 ± 0,89 µM Fe II/g bu
Couve	36,2 ± 1,05 µM trolox/g bs	20,7 µM trolox/g bs	8,44 µM trolox/g bs	Sikora <i>et al.</i> (2008)
		6,4 µM trolox/g bs		Korus (2011)
Couve de Bruxelas	32,1 ± 1,71 µM trolox/g bs			Sikora <i>et al.</i> (2008)
	1,91 ± 0,33 mg aa/g bu		5,55 ± 0,51 µmol/g bu	Kaulmann <i>et al.</i> (2014)
Couve-flor	20,9 ± 0,55 µM trolox/g bs	3,16 µM trolox/g bs	7,03 µM trolox/g bs	Sikora <i>et al.</i> (2008)
	0,72 ± 0,03 mg aa/g bu			5,33 ± 0,36 µmol Fe II/ g bu
Repolho		4,54 µM trolox/g bs	6,77 µM trolox/g bs	Soengas <i>et al.</i> (2012)
	0,67 ± 0,11 mg aa/g bu			2,14 ± 0,44 µmol Fe II/g bu

*Média ± desvio padrão; ^aÁcido 2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico sal diamônio; ^b2,2-difenil-1-picrilhidrazil; ^cMétodo de redução do ferro; aa: ácido ascórbico; Trolox: Solução antioxidante aquosa equivalente a vitamina E (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico). bs: base seca; bu: base úmida. Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

De acordo com Kaulmann *et al.* (2014) a capacidade antioxidante das Brassicas está relacionada com a composição de flavonoides, antocianinas, luteínas, vitamina C e ácidos neoclorogênicos. Os mesmos autores observaram que as variedades de coloração roxa e verde apresentaram maior capacidade antioxidante que as de coloração branca.

Estudo feito por Girgin e El (2015) indica que a capacidade antioxidante das Brassicas pode aumentar com o cozimento a vapor devido à liberação dos compostos pela matriz celular, entretanto pode diminuir com a fervura pelo fato que os compostos antioxidantes, como a vitamina C e os polifenóis, são hidrossolúveis, então são perdidos por lixiviação. Sikora *et al.* (2008) também verificaram essas reduções em vegetais de Brassicas submetidos a processos hidrotérmicos.

O estágio de maturação da planta influencia no teor de antioxidantes, de acordo com Soengas *et al.* (2012) a variedade de couve-flor analisada apresenta maior atividade antioxidante na fase de brotos e com dois meses, já na couve o teor é maior quando a planta está na fase de três meses após a semeadura, isso é

confirmado por Korus (2011) que analisou folhas de couve em três estádio de maturação e verificou aumento de 22%, do primeiro ao terceiro estádio, na atividade antioxidante. Além disso, Šamec *et al.* (2011) certificaram que há o aumento da capacidade, com altos teores entre 8 e 12 semanas, contudo a partir desse tempo a capacidade antioxidante sofre diminuição gradual.

Como a couve pode apresentar variações do potencial em função do estádio de maturação e após processamentos, portanto é necessário determinar as melhores condições para a extração de compostos antioxidantes desse vegetal. De acordo com os trabalhos citados anteriormente, a couve tem alto potencial antioxidante em relação aos outros vegetais da mesma espécie (Tabela 1).

Outros compostos podem estar relacionados com a atividade antioxidante, como os glucosinolatos, que pertencem a uma classe de metabólitos secundários de plantas, principalmente da Brassicaceae. Dos 15 glucosinolatos estudados *in vitro* por Natella *et al.* (2014), cinco apresentaram capacidade antioxidante. De acordo com os autores não apenas os glucosinolatos contribuem para o potencial antioxidante mas a combinação dos compostos da planta. Os mesmo sugerem que a partir de uma combinação de antioxidantes e testes de análise multivariada é possível obter uma caracterização clara dessas propriedades das moléculas bioativas.

Os compostos antioxidantes, como fenóis, flavonoides, luteínas, vitamina C, glucosinolatos, isotiocianatos, entre outros, influenciam nas propriedades nutracêuticas das variedades *Brassica oleracea*. Inclusive essas propriedades vêm sendo bastante estudadas, com resultados que demonstram o potencial desses vegetais como promotores da saúde.

Os fitoconstituintes presentes na couve conferem outros benefícios ao organismo. Os compostos antioxidantes flavonoides, terpenos e esteróis foram identificados em extrato hidroalcoólico de folhas de couve e foram associados com a eficiente proteção do DNA de ratos e com a ausência de efeitos genotóxicos quando submetidos ao extrato, as atividades antígenotóxicas deste extrato são de grande importância farmacológica e podem ser benéficas para a prevenção do câncer (GONÇALVES *et al.*, 2012).

A antioxidação por flavonoides foi um dos mecanismos relatados por Agbaje e Okpara (2013) na atividade antiúlcera de extratos de couve *in vivo*, foram identificados no extrato: alcaloides, taninos, glicosídeos cardíacos, flavonoides, flobataninos, antraquinonas e saponinas. A couve também foi estudada na redução de doença arterial coronariana em homens com colesterol alto a partir da suplementação da alimentação com suco de couve (KIM *et al.*, 2008) e estimulação do sistema imunológico por extrato de couve (NISHI *et al.*, 2011) e na inibição da proliferação de células de câncer (OLSEN *et al.*, 2012).

Portanto, devido à presença de compostos que conferem propriedades antioxidantes e fitoterapêuticas, o consumo deste vegetal traz diferentes benefícios ao organismo humano. Dessa forma, a couve apresentou grande potencial nos diferentes estudos. O enriquecimento de produtos alimentícios com extratos de couve é uma vertente promissora em virtude de seus benefícios à saúde.

3.2 Propriedades antimicrobianas de *Brassica oleracea* var. *acephala*

As variedades pertencentes à espécie *Brassica oleracea* são frequentemente estudadas quanto às suas propriedades antimicrobianas. Na literatura essas propriedades são altamente relacionadas à composição fitoquímica, que incluem

polifenóis, glucosinolatos e algumas proteínas, e mais recentemente estão sendo estudadas as nanopartículas de ouro e prata produzidas a partir desses vegetais que atuam como inibidores microbianos. Além disso, muitos dos compostos extraídos atuam tanto em fungos como em bactérias e geralmente sem distinção taxonômica para Gram positivos e negativos.

O potencial antimicrobiano de variedades de *Brassica oleracea* foi avaliado por Vale *et al.* (2015) em Portugal sobre importantes bactérias responsáveis por DTA (Doenças Transmitidas por Alimentos), neste caso, *Escherichia coli* O 157: H7, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*. Todos os extratos de brotos de repolho roxo, brócolis, couve galega e repolho analisados, obtidos com metanol a 70%, mostram atividade antimicrobiana, sendo que os extratos de brócolis e repolho roxo foram mais eficientes. A resistência aos extratos não teve associação com as espécies de microrganismos, a bactéria mais sensível e a mais resistente, ambos foram Gram negativos. No estudo da associação entre a composição fitoquímica e a atividade antimicrobiana, os ácidos orgânicos mais relevantes foram ácido xiquímico na couve galega, ácido cítrico no brócolis e ácido málico no repolho roxo.

Observa-se que há diferença no potencial antimicrobiano entre as diferentes variedades de *Brassica oleracea*. Além disso, o potencial também pode variar nas diferentes partes de uma mesma variedade, como é demonstrado em estudo feito por Ayaz *et al.* (2008) na Turquia com folhas e sementes de couve, no qual foram extraídas frações de ácidos fenólicos nas formas livre, éster (solúvel em metanol), glicosídeo e éster ligado (insolúvel em metanol).

Todas as frações de ácidos fenólicos extraídas das folhas inibiram eficientemente as bactérias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Bacillus subtilis*) e Gram negativa (*Moraxella catarrhalis*), apenas as formas éster e éster ligado inibiram os fungos *Candida tropicalis* e *Candida albicans*. Já as frações fenólicas extraídas das sementes apresentaram menor eficiência, o que confirma a variação do potencial antimicrobiano. A fração éster ligado apresentou maior espectro de atividade antimicrobiana, sendo eficaz contra bactérias Gram positivas e negativas e fungos. A atuação da couve sobre as Gram negativas é considerada como um diferencial, pois os antibióticos são menos ativos sobre essa classe, provavelmente devido à complexidade da estrutura da parede celular. No geral, as folhas e sementes da couve apresentaram atividade antimicrobiana de alta a moderada (AYAZ *et al.*, 2008).

Entre os fitoquímicos com propriedades antimicrobianas, têm-se os glucosinolatos que são precursores dos isotiocianatos, altamente presentes nas Brassicas. Em um estudo feito em Portugal por Borges *et al.* (2014) foi analisada a atividade de dois isotiocianatos (ITC's) obtidos comercialmente, são eles isotiocianato de alilo (AITC) e isotiocianato de 2-feniletilo (PEITC), quanto à prevenção e controle de biofilmes formados por bactérias. AITC teve ação preventiva nos biofilmes de *E. coli*, *P. aeruginosa* e *L. monocytogenes*, enquanto PEITC preveniu apenas biofilmes de *S. aureus*. Quanto à inativação, AITC e PEITC inativaram de 70 a 80% dos biofilmes testados, o modo de ação antimicrobiano dos ITC's é atribuído à ligação com grupos sulfidrilas em sítios ativos de enzimas importantes para o crescimento e sobrevivência microbianos. Os autores salientam que os ITC's podem ser uma estratégia de intervenção eco-inovadora para prevenir e controlar biofilmes, com potencial de aplicação no setor de alimentos. Como são mais difíceis de retirar, os biofilmes são aglomerados microbianos que podem ocasionar contaminação, uma grande preocupação para a indústria de alimentos.

Outros estudos recentes indicam o potencial de inibição microbiana de nanopartículas de ouro e prata biosintetizadas de extrato etanólico de brócolis (KUPPUSAMY *et al.*, 2015), nanopartículas de ouro (PIRUTHIVIRAJ *et al.*, 2016) e de prata (CAROLING *et al.*, 2013) de extrato aquoso de brócolis e de nanopartículas de prata de extrato aquoso de couve-flor (RANJITHAM *et al.*, 2013). Porém, não foram encontrados estudos utilizando a couve.

Em estudo feito por Sanz-Puig *et al.* (2015a) analisando o potencial inibidor frente à *Listeria monocytogenes*, os autores relataram que a capacidade bactericida da couve-flor pode estar relacionada ao elevado teor de polifenóis. Dessa forma, como a composição fitoquímica presente nas brassicas está entre as principais responsáveis pelas propriedades antimicrobianas. Foram identificados nove ácidos fenólicos derivados de ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinâmicos em folhas de couve, são eles gálico, protocatecuico, p-hidroxibenzoico, vanílico, salicílico, p-cumárico, cafeico, ferúlico e sinápico, os mais abundantes foram felúrico e cafeico, além desses, o ácido salicílico foi identificado nas sementes de couve (AYAZ *et al.*, 2008). Quanto aos ácidos orgânicos encontrados em couve, identificaram-se principalmente, ácido oxálico, málico, cítrico, maleico, aconitato, ascórbico e chiquímico (AYAZ *et al.*, 2006; VALE *et al.*, 2015). Identificaram na couve compostos fenólicos com alto grau de glicosilação e acilação (alto peso molecular), o nível total de carotenoides encontrado foi de 155,4 µg/g e os principais carotenoides foram all-trans-β-caroteno (38%) e all-trans-luteína (36%) (MURADOR *et al.*, 2016).

É importante salientar que esses vegetais podem apresentar compostos antinutricionais como os taninos, fitatos e ácido oxálico que interferem na biodisponibilidade dos nutrientes, contudo, dependendo da concentração os mesmos não provocam riscos à saúde e podem ser reduzidos com tratamentos térmicos (SANTOS, 2006; SALVINO, 2014).

Ressalta-se que o tipo de solvente utilizado na extração tem influência considerável sobre o conteúdo de fitoquímicos e atividade antimicrobiana. Os maiores rendimentos utilizando *Brassica oleracea* foram obtidos em solvente metanol, etanol, acetona e aquoso (JAISWAL *et al.*, 2012; BEGUM; POONKOTHAI, 2013). Quando o objetivo é a adição dos extratos em alimentos devem-se considerar quais não são tóxicos para o consumo humano. Portanto, é importante saber que o extrato aquoso de couve-flor apresentou moderada ação, com diâmetros de inibição variando de 14 a 19 mm, para *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, respectivamente (BEGUM; POONKOTHAI, 2013).

Na Tabela 2 são apresentados, em suma, os vegetais da espécie *Brassica oleracea* e microrganismos analisados por pesquisadores. Observa-se que esses vegetais apresentam potencial inibidor sobre diversos microrganismos, como bactérias (Gram positivos e Gram negativos) e fungos. Contudo foram encontradas poucas pesquisas relacionadas com a couve. Além disso, são escassos os estudos antimicrobianos com as variedades de couve cultivadas no Brasil.

Tabela 2 – Vegetais e subprodutos de *Brassica oleracea* com ação antimicrobiana

Vegetais		Microrganismos*	Referência	País
Analisados	Mais eficientes			
Folhas e sementes de couve	Folhas de couve	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Moraxella catarrhalis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Candida tropicalis</i> e <i>Candida albicans</i>	Ayaz <i>et al.</i> (2008)	Turquia
Isolado proteico da semente Repolho roxo	-	<i>Mycosphaerella arachidicola</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Candida albicans</i>	Ye <i>et al.</i> (2011)	China
Brócolis, repolho branco e broto de couve de Bruxelas	Brócolis	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Salmonella abony</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>E. faecalis</i>	Jaiswal, Abu-Ghannam e Gupta (2012)	Irlanda
Couve-flor	Extrato de acetona de couve-flor	<i>P. aeruginosa</i> , <i>E.coli</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Shigella flexneri</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> e <i>Cladosporium species</i>	Begum e Poonkothai (2013)	Índia
Subprodutos de Couve-flor	Subproduto a 10% (m/v) a 22°C	<i>L. monocytogenes</i> submetida a 10% de subproduto a 22°C e <i>L. monocytogenes</i> a 5°C	Sanz-Puig <i>et al.</i> (2015a)	Espanha
Brotos de repolho roxo, brócolis, couve galega e repolho	Brócolis e repolho roxo	<i>E. coli</i> O 157: H7, <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Bacillus cereus</i> e <i>Salmonella typhimurium</i>	Vale <i>et al.</i> (2015)	Portugal
Subprodutos de couve-flor e brócolis	Couve-flor	<i>S. typhimurium</i> , <i>B. cereus</i> e <i>E. coli</i> O157: H7	Sanz-Puig <i>et al.</i> (2015b)	Espanha
Nanopartículas de ouro sintetizadas por flores de brócolis	-	<i>Klebsiella pneumonia</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Candida albicans</i> e <i>Aspergillus flavus</i>	Piruthiviraj, Margret, Krishnamurthy (2016)	Índia

*Ordenados dos mais sensíveis aos mais resistentes frente aos vegetais “Mais eficientes”. Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

Observa-se que brócolis e couve-flor são bastante estudados e apresentam considerável eficiência na inibição microbiana. Mas salienta-se que folhas de couve também podem ser eficientes, pois em estudo apresentaram significativa inibição com halos de até 24 mm (AYAZ *et al.*, 2008). Infere-se que as diferentes partes das plantas, os solventes utilizados na extração e as concentrações influenciam na capacidade antimicrobiana.

É satisfatória a observação de que muitas das bactérias que podem ser veiculadas por alimentos são sensíveis aos extratos de Brassicas. Assim, justifica-se a utilização destes compostos antimicrobianos nos alimentos, principalmente de origem animal, para evitar contaminações e DTA's. Visto que esses estudos são escassos no Brasil, há a necessidade de avaliar essas propriedades nas variedades cultivadas nacionalmente.

Por outro lado, a ação antimicrobiana desses extratos pode interferir em microrganismos desejáveis nos produtos alimentícios como, por exemplo, as bactérias lácticas responsáveis pela fermentação de alguns produtos, como salame, iogurte, queijo, bebida láctea fermentada, entre outros. Portanto, deve-se atentar a uma dose mínima que iniba os microrganismos patogênicos e não interfiram na fermentação das bactérias lácticas.

3.3 Bebida láctea fermentada como alimento funcional e utilização de *Brassica oleracea* em produtos alimentícios

Bebida láctea fermentada é definida como o produto lácteo resultante da mistura do leite e o soro de leite adicionado ou não de produtos ou substâncias alimentícias, fermentado mediante a ação de cultivo de microrganismos específicos (BRASIL, 2005). Como a bebida láctea fermentada pode ser adicionada de produtos não lácteos, na literatura existem trabalhos em que mostram diversos produtos que são utilizados a fim de torna-las funcionais. Benedetti (2014) adicionou soro de tofu concentrado (10% e 20%) na elaboração de bebidas lácteas fermentadas, visando à incorporação de isoflavonas da soja, correlacionados positivamente com a atividade antioxidante.

A utilização do soro de tofu concentrado na elaboração de bebida láctea fermentada não interferiu na sobrevivência das bactérias ácido-láticas, além disso, as amostras adicionadas apresentaram perfil similar quanto ao comportamento do pH, acidez e índice de sinérese em relação ao padrão ao longo do tempo de armazenamento. Portanto, o soro de tofu concentrado pode ser utilizado para obtenção de uma bebida láctea fermentada com atividade biológica especial, conferida pelas isoflavonas e oligossacarídeos da soja (BENEDETTI, 2014).

Já Ribeiro *et al.* (2014) utilizaram a planta *Camellia sinensis* na formulação da bebida láctea fermentada, adicionada nas proporções de 10, 20, 30 e 40% (m/m). A adição de *C. sinensis* na formulação da bebida não influenciou o teor de massa seca, a umidade, o resíduo mineral fixo e a contagem total de bactérias lácticas, e apesar de haver redução nos teores de proteína e na viscosidade, houve aumento na atividade antioxidante e redução nos teores de gordura e sódio conforme aumentou a porcentagem de infusão. Inclusive observou-se melhor aceitação e maior intenção de compra para a formulação de bebida láctea fermentada com 30% de infusão de *C. sinensis*.

Silva *et al.* (2014b) utilizaram resíduos do processamento de suco de mirtilo (*Vaccinium myrtillus* L.) em diferentes concentrações (20, 30 e 40% m/m) na formulação de bebida láctea fermentada. Verificaram que a amostra de 30%, uma

das mais preferidas na análise sensorial, apresentou expressivo teor de compostos fenólicos, ao mesmo tempo, atendeu aos parâmetros de qualidade e identidade para proteínas, bactérias lácticas e coliformes totais e termotolerantes, conforme a legislação, evidenciando o aproveitamento do resíduo para o enriquecimento da bebida com compostos bioativos (SILVA *et al.*, 2014b).

Outros autores adicionaram produtos alimentícios à bebida láctea fermentada para o enriquecimento, utilizaram-se o amaranto nas formulações da bebida devido ao elevado teor de proteínas de alto valor biológico, com concentrações finais acima de 2,5% e estabilidade nos 35 dias de armazenamento (MASSON; VIGANÓ, 2013). E produtos adicionados à base de soja, como isolado proteico de soja (GOMES, PENNA, 2009) e extrato hidrossolúvel de soja (KEMPKA *et al.*, 2008; KRÜGER *et al.*, 2008).

Observa-se que como é possível a adição de produtos não lácteos à bebida láctea fermentada e é desejo do consumidor adquirir produtos enriquecidos e funcionais, é válida a adição de extratos de *Brassica oleracea* com o objetivo de desenvolver um produto novo com compostos bioativos.

Encontram-se na literatura trabalhos em que é avaliada a adição de couve ou seus produtos em áreas do setor alimentício como forma principalmente de enriquecimento e funcionalidade, entre outras. Salvino (2014) utilizou couve branqueada e desidratada (2,5 e 5,0%) em formulações de pão de forma, a adição da couve não afetou as características tecnológicas dos pães, bem como promoveu aumento no teor de fibras e minerais como cálcio, fósforo, potássio e magnésio. Quanto ao componente antinutricional ácido oxálico, as concentrações obtidas nos pães foram bem abaixo do considerado de risco à saúde (2g kg⁻¹ p. c.) (SALVINO, 2014). Na análise sensorial os pães com adição de couve apresentaram boa aceitação, principalmente em relação à maciez. O uso da couve branqueada desidratada na formulação de pão de forma resultou em produtos de maior valor nutricional, boa aceitação sensorial e oferece ao consumidor novidade nas opções de consumo desse tipo de pão (SALVINO, 2014). Apesar da limitação quanto ao odor e sabor de couve na aplicação de extratos de *Brassica oleracea* var. *acephala* em alguns produtos, seu uso é favorecido para criação de novos sabores e incentivando também inovação em produtos alimentícios.

Em outro estudo, Mauro, Silva e Freitas (2010) confeccionaram *cookies* com 15% de farinha de talos de couve manteiga. Comparando com o controle, os *cookies* apresentaram menor teor de gordura e densidade calórica e maior teor de umidade, proteínas e fibras, apresentaram-se mais espessos, devido provavelmente à maior quantidade de materiais fibrosos, além disso, a aceitação foi satisfatória. Segundo os autores a farinha de talos são matérias-primas de baixo custo e boas alternativas para a aplicação em produtos hipocalóricos ricos em fibras. A utilização de subprodutos é interessante, pois pode aumentar o conteúdo de fibras e o teor de cinzas, ou seja, aumentar o teor de minerais.

Verifica-se que o uso desses vegetais em formulações pode ser eficiente quanto às características tecnológicas, enriquecimento nutricional e aceitação sensorial, entretanto, a coloração final no produto pode influenciar na aceitação do consumidor, por ser diferente do convencional. Então, deve-se fazer campanhas educativas a cerca da importância de consumo desses vegetais para saúde e assim aumentar sua aceitação (SALVINO, 2014).

Não foram encontrados trabalhos onde a couve foi adicionada em matrizes lácteas, como será estudado no presente trabalho. Encontra-se na literatura outros estudos em que foram adicionados *Brassica oleracea* em produtos alimentícios,

como brócolis em pão de forma (ZAMBELLI *et al.*, 2015), farinha de subprodutos de brócolis em nhoque tradicional (MALUCELLI *et al.*, 2009), além disso, extratos de brócolis apresentaram efeito hepatoprotetor em ratos tratados com aditivos alimentares conservante nitrito de sódio (NaNO₂) e corante amarelo-sol, de acordo com os autores este fato está relacionado com o efeito antioxidante dos compostos fenólicos e flavonoides (SARHAN; SHATI; ELSAID, 2014).

Outra área do setor alimentício que os produtos de *Brassica oleracea* podem ser adicionados é nas embalagens inteligentes. Pesquisadores desenvolveram indicadores de tempo-temperatura adicionados de antocianinas provenientes de extrato de repolho roxo (PEREIRA JÚNIOR, ARRUDA; STEFANI, 2015; SILVA-PEREIRA *et al.*, 2015) a fim de indicar indiretamente alterações de qualidade dos alimentos, através da detecção de mudanças no pH dos produtos alimentares embalados quando submetidos a temperaturas inadequadas de armazenamento.

Deste modo, verifica-se a ampla utilização e as potencialidades desses vegetais, principalmente a couve, e seus produtos no setor alimentício. Como foi visto nos tópicos anteriores seus potenciais antioxidantes e fitoterápicos, com isso é de suma importância que esses potenciais benéficos sejam veiculados à população, a partir de alimentos de fácil aceitação, com o objetivo de promoção da saúde. Como forma de demonstrar a importância do enriquecimento da bebida láctea fermentada com extrato de couve, pode-se observar da tabela 3 os nutrientes que compõem a bebida e os nutrientes da couve.

Tabela 3- Composição nutricional de bebida láctea fermentada (50% de leite e 50% de soro de leite) e de couve manteiga ambos em porção de 100 gramas (TACO, 2006).

Valor nutricional	Bebida láctea fermentada	Couve manteiga
Valor energético (kcal)	91,7	27,1
Carboidrato (g)	16,8	4,3
Proteína (g)	1,9	2,9
Lipídios (g)	1,9	0,6
Fibra (g)	-	3,1
Cálcio (mg)	70,0	130,9
Ferro (mg)	-	0,5
Fósforo (mg)	49,9	48,7
Sódio (mg)	29,3	6,2
Vitamina C (mg)	-	96,7

Verifica-se que além da couve possuir nutrientes que não estão presentes na bebida, como fibra alimentar, ferro e vitamina C, ainda há maiores teores de proteínas e cálcio. Dessa forma, pode-se observar que a adição de extrato de couve na bebida láctea fermentada pode levar ao desenvolvimento de um produto enriquecido nutricionalmente.

Referências

- AGBAJE, E. O.; OKPARA, C. S. Antiulcer activity of aqueous extract of fresh leaf of *Brassica oleraceae* linn. Var. *Acephala* (d.c) alef) (Brassicaceae). **International Research Journal of Pharmacy**, v. 4, n. 8, p. 107-111, 2013.
- AYAZ, F. A. *et al.* Nutrient contents of kale (*Brassica oleraceae* L. var. *acephala* DC.). **Food Chemistry**, v. 96, p. 572-579, 2006.
- AYAZ, F. A. *et al.* Phenolic acid contents of kale (*Brassica oleraceae* L. var. *acephala* DC.) extracts and their antioxidant and antibacterial activities. **Food Chemistry**, v. 107, p. 19-25, 2008.
- BEGUM, A. R.; POONKOTHAI, M. In vitro antimicrobial activity and phytochemical analysis of *Brassica oleracea*. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 2, p. 405-408, 2013.
- BENEDETTI, S. **Avaliação do emprego da crioconcentração e da nanofiltração nas propriedades de compostos funcionais do soro de tofu e aplicação do concentrado na obtenção de bebida láctea fermentada**. 2014. 189 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.
- BORGES, A. *et al.* The action of selected isothiocyanates on bacterial biofilm prevention and control. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 86, p. 25-33, 2014.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 16, de 23 de agosto de 2005. Regulamento técnico de identidade e qualidade de bebida láctea. **Diário Oficial da União – D.O.U.** Brasília, DF, 24 ago. 2005.
- CAETANO, R. S.; SOUZA, A. C. R.; FEITOZAO, L. F. O uso de plantas medicinais utilizadas por frequentadores dos ambulatórios Santa Marcelina, Porto Velho - RO. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 7, n. 1, p. 55-63, 2014.
- CAROLING, G. *et al.* Biosynthesis of silver nanoparticles using aqueous broccoli extract characterization and study of antimicrobial, cytotoxic effects. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 6, n. 4, p. 165-172, 2013.
- COUTO, M. A. L.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Quantificação de vitamina C e capacidade antioxidante de variedades cítricas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, p. 15-19, 2010.
- GIRGIN, N.; EL, S. N. Effects of cooking on in vitro sinigrin bioaccessibility, total phenols, antioxidant and antimutagenic activity of cauliflower (*Brassica oleraceae* L. var. *Botrytis*). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 37, p. 119-127, 2015.
- GOMES, R. G.; PENNA, A. L. B. Características reológicas e sensoriais de bebidas lácteas funcionais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30, n. 3, p. 629-646, 2009.

GONÇALVES, Á. L. M. *et al.* Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of *Brassica oleracea* L. var. *acephala* D.C. indifferent cells of mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, p. 740-745, 2012.

JAISWAL, A. K.; ABU-GHANNAM, N.; GUPTA, S. A comparative study on the polyphenolic content, antibacterial activity and antioxidant capacity of different solvent extracts of *Brassica oleracea* vegetables. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, p. 223-231, 2012.

KAULMANN, A. *et al.* Carotenoids, polyphenols and micronutrient profiles of *Brassica oleracea* and plum varieties and their contribution to measures of total antioxidant capacity. **Food Chemistry**, v. 155, p. 240-250, 2014.

KEMPKA, A. P. *et al.* Formulação de bebida láctea fermentada sabor pêssego utilizando substratos alternativos e cultura probiótica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 170-177, 2008.

KIM, S. Y. *et al.* Kale juice improves coronary artery disease risk factors in hypercholesterolemic men. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 21, p. 91-97, 2008.

KORUS, A. Level of vitamin C, polyphenols, and antioxidant and enzymatic activity in three varieties of kale (*Brassica oleracea* L. Var. *Acephala*) at different stages of maturity. **International Journal of Food Properties**, v. 14, p. 1069-1080, 2011.

KRÜGER, R. *et al.* Desenvolvimento de uma bebida láctea probiótica utilizando como substratos soro de leite e extrato hidrossolúvel de soja. **Alimentos e Nutrição**, v. 19, n. 1, p. 43-53, 2008.

KUPPUSAMY, P. *et al.* Intracellular biosynthesis of Au and Ag nanoparticles using ethanolic extract of *Brassica oleracea* L. and studies on their physicochemical and biological properties. **Journal of Environmental Sciences**, v. 29, p. 151-157, 2015.

MALUCELLI, M. *et al.* Avaliação e composição nutricional de nhoque tradicional enriquecido com farinha de resíduo de brócolis (*Brassica oleracea* var. *itálica*). **Alimentos e Nutrição**, v. 20, n. 4, p. 553-560, 2009.

MASSON, A. P.; VIGANÓ, O. J. Bebida láctea com amarantho. **E-Tech: Tecnologia para Competitividade Industrial**, v. 7, n. 2, p. 165-185, 2013.

MAURO, A. K.; SILVA, V. L. M. D.; FREITAS, M. C. J. Caracterização física, química e sensorial de *cookies* confeccionados com Farinha de Talo de Couve (FTC) e Farinha de Talo de Espinafre (FTE) ricas em fibra alimentar. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 3, p. 719-728, 2010.

MESSIAS, M. C. T. B. *et al.* Uso popular de plantas medicinais e perfil socioeconômico dos usuários: um estudo em área urbana em Ouro Preto, MG, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 1, p. 76-104, 2015.

MURADOR, D. C.; MERCADANTE, A. Z.; ROSSO, V. V. D. Cooking techniques improve the levels of bioactive compounds and antioxidant activity in kale and red cabbage. **Food Chemistry**, v. 196, p. 1101-1107, 2016.

NATELLA, F. *et al.* Glucosinolates redox activities: Can they act as antioxidants? **Food Chemistry**, v. 149, p. 226-232, 2014.

NISHI, K. *et al.* Immunostimulatory in vitro and in vivo effects of a water-soluble extract from kale. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 75, n. 1, p. 40-46, 2011.

NULL, G.; FELDMAN, M. The health-boosting properties of Super Foods. **Townsend Letter**, p. 62-67, 2011.

OLSEN, H. *et al.* Antiproliferative Effects of Fresh and Thermal Processed Green and Red Cultivars of Curly Kale (*Brassica oleracea* L. convar. *acephala* var. *sabellica*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 7375-7383, 2012.

PEREIRA JÚNIOR, V. A.; ARRUDA, I. N. Q. D.; STEFANI, R. Active chitosan/PVA films with anthocyanins from *Brassica oleraceae* (Red Cabbage) as Time-Temperature Indicators for application in intelligent food packaging. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 180-188, 2015.

PIRUTHIVIRAJ, P.; MARGRET, A.; KRISHNAMURTHY, P. P. Gold nanoparticles synthesized by *Brassica oleracea* (Broccoli) acting as antimicrobial agents against human pathogenic bacteria and fungi. **Appl Nanosci**, v. 6, p. 467-473, 2016.

RANJITHAM, D. A. M. *et al.* In vitro evaluation of antioxidant, antimicrobial, anticancer activities and characterisation of *Brassica oleracea*. Var. *Bortrytis*. L synthesized silver nanoparticles. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 4, p. 239-251, 2013.

RIBEIRO, O. A. S. *et al.* Bebida láctea fermentada formulada com *Camellia sinensis*. **Boletim CEPPA**, v. 32, n. 2, p. 289-304, 2014.

RIGUEIRA, G. D. J.; BANDEIRA, A. V. M.; CHAGAS, C. G. O.; MILAGRES, R. C. R. M. Atividade antioxidante e teor de fenólicos em couve-manteiga (*brassica oleracea* l. var. *acephala*) submetida a diferentes sistemas de cultivo e métodos de preparo. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 37, n. 2, p. 3-12, 2016.

SALVINO, E. M. **Avaliação química e nutricional de couve (*Brassica oleracea* var. *acephala*) desidratada e aplicação em formulações de pão de forma**. 2014. 85 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2014.

ŠAMEC, D. *et al.* Antioxidant potency of white (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) and Chinese (*Brassica rapa* L. var. *pekinensis* (Lour.)) cabbage: The influence of development stage, cultivar choice and seed selection. **Scientia Horticulturae**, v. 128, p. 78-83, 2011.

SANTOS, M. A. T. D. Efeito do cozimento sobre alguns fatores antinutricionais em folhas de brócoli, couve-flor e couve. **Ciência e Agortecnologia**, v. 30, n. 2, p. 294-301, 2006.

SANZ-PUIG, M. *et al.* Antimicrobial Potential of Cauliflower, Broccoli, and Okara Byproducts Against Foodborne Bacteria. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 12, n. 1, p. 39-46, 2015a.

SANZ-PUIG, M. *et al.* Antimicrobial activity of cauliflower (*Brassica oleracea* var. Botrytis) by-product against *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 50, p. 435-440, 2015b.

SARHAN, M. A. A.; SHATI, A. A.; ELSAID, F. G. Biochemical and molecular studies on the possible influence of the *Brassica oleracea* and Beta vulgaris extracts to mitigate the effect of food preservatives and food chemical colorants on albino rats. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 21, p. 342-354, 2014.

SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 4, p. 397-409, 2004.

SIKORA, E. *et al.* The antioxidant activity of selected cruciferous vegetables subjected to aquathermal processing. **Food Chemistry**, v. 107, p. 55-59, 2008.

SILVA, J. D. F. *et al.* Avaliação sensorial, físico-química e microbiológica de bebida láctea fermentada adicionada de resíduo do processamento de suco de mirtilo (*Vaccinium myrtillus*, L.). In: XX Congresso Brasileiro De Engenharia Química, Engenharia e Tecnologia de Alimentos, 2014, Florianópolis, **Anais...** Florianópolis: UFSC/EQA, 2014b. p. 1-8.

SILVA, T. P. D. *et al.* Levantamento de espécies vegetais e utilização em quintal agroflorestal de estabelecimento agrícola no assentamento Alegria - Marabá, Pará. **Agroecossistemas**, v. 6, n. 1, p. 103-109, 2014a.

SILVA-PEREIRA, M. C. *et al.* Chitosan/corn starch blend films with extract from *Brassica oleraceae* (red cabbage) as a visual indicator of fish deterioration. **LWT - Food Science and Technology**, v. 61, p. 258-262, 2015.

SOENGAS, P. *et al.* New insights into antioxidant activity of Brassica crops. **Food Chemistry**, v. 134, p. 725-733, 2012.

SOUZA, B. N. O. *et al.* Diversidade e uso das plantas cultivada na comunidade cinturão Colina Verde, Cuiabá - MT, Brasil. **Biodiversidade**, v. 14, n. 3, p. 84-93, 2015.

TACO 2006. **Tabela brasileira de composição de alimentos**. 2nd ed. NEPA-UNICAMP, Campinas, Brasil.

VALE, A. P. *et al.* Phytochemical composition and antimicrobial properties of four varieties of *Brassica oleracea* sprouts. **Food control**, v. 55, p. 248-256, 2015.

VASCONCELLOS, M. M. *et al.* Avaliação preliminar do potencial antioxidante de pitanga roxa (*Eugenia uniflora* L.) em *Caenorhabditis elegans*. In: VII Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão, 2015, Rio Grande do Sul, **Anais...** Rio Grande do Sul: Unipampa, 2015. P. 1-2.

WANG, B.; ZHANG, X. Inhibitory Effects of Broccolini Leaf Flavonoids on Human Cancer Cells. **Scanning**, v. 34, p. 1-5, 2012.

YE, X. J. *et al.* Protein from red cabbage (*Brassica oleracea*) seeds with antifungal, antibacterial, and anticancer activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 10232-10238, 2011.

ZAMBELLI, R. A. *et al.* Efeito da estocagem de massas congeladas nos parâmetros colorimétricos de pães tipo forma adicionados de ingredientes funcionais. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 10, n. 1, p. 62-68, 2015.

1 **ARTIGO:**

2 **ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DE EXTRATO AQUOSO DE**
3 **COUVE E POTENCIAL SUPLEMENTAÇÃO EM BEBIDA LÁCTEA FERMENTADA**

4
5 (Normas da Revista ActaScientiarum. Agronomy)

6 **Resumo**

7 Objetivou-se avaliar o potencial antioxidante e antimicrobiano, bem como quantificar os
8 teores de compostos fenólicos e flavonoides em extrato aquoso de couve e a viabilidade da
9 adição em bebida láctea fermentada. As folhas foram submetidas a quatro tratamentos: frescas
10 trituradas em liquidificador, frescas pulverizadas em nitrogênio líquido, secagem em estufa
11 por 72h (45°C) e congelamento (-20°C). Foram determinadas a atividade antioxidante,
12 concentração de compostos fenólicos e flavonoides. A atividade antimicrobiana foi analisada
13 frente à *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Escherichia coli* ATCC 8759 e *Salmonella*
14 *choleraesuis* ATCC 10708. Preparou-se a bebida láctea fermentada adicionada do extrato de
15 couve de folhas secas nas concentrações de 5%, 10%, 15%, 15% com sorbato e o controle e
16 foi determinada a atividade antioxidante e a contagem de bactérias lácticas. O delineamento foi
17 inteiramente casualizado com médias comparadas pelo teste Tukey a 5%. As folhas secas e
18 congeladas apresentaram os maiores resultados de atividade antioxidante, e juntamente com
19 as folhas pulverizadas não diferiram quanto aos compostos fenólicos, apresentando os
20 melhores teores. As folhas pulverizadas tiveram maior rendimento de flavonoides. Os extratos
21 aquosos de couve não apresentaram atividade antimicrobiana. A bebida láctea com adição de
22 15% do extrato aquoso de couve apresentou 36% de atividade antioxidante.

23 **Palavras-chave:** *Brassica oleracea* var. *acephala*; fenólicos; flavonoides; extrato aquoso;
24 DPPH.

25
26 **ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF AQUEOUS EXTRACT OF**
27 **KALE AND POTENTIAL SUPPLEMENTATION IN FERMENTED DAIRY DRINK**

28 **Abstract**

29 The aim in this study was to evaluate the antioxidant and antimicrobial capacity of kale
30 leaves, as well as quantifying the contents of phenolic compounds and flavonoids present in

31 its aqueous extract and the viability when added in fermented lactic drink. The leaves were
32 submitted to four treatments: fresh crushed in a blender, fresh pulverized with liquid nitrogen,
33 oven drying for 72 h (45°C) and freezing (-20°C). It was determined to the antioxidant
34 activity, concentration of total phenolic compounds and flavonoids. The antimicrobial activity
35 was analyzed against *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Escherichia coli* ATCC 8759 e
36 *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708. The fermented lactic drink was prepared adding
37 quantities of 5%, 10%, 15%, 15% with sorbate and control of dried kale leaf extract and was
38 determined the antioxidant activity and the number of lactic bacteria. The statistical design of
39 the experiment was completely randomized and the averages were compared by Tukey test
40 5%. As for antioxidant activity, the dry and frozen leaves presented the best results and when
41 compared to the fresh pulverized leaves they did not differ in phenolic compounds, presenting
42 the best contents. Fresh leaves pulverized showed a higher yield of flavonoids. The aqueous
43 extracts of kale leaves did not present antibacterial activity against the microorganisms
44 studied. The milk beverage with 15% added of the aqueous extract of cabbage presented 36%
45 of antioxidant activity.

46 **Keywords:** *Brassica oleracea* var. *acephala*; phenolic; flavonoids; aqueous extract; DPPH.

47

48 INTRODUÇÃO

49 Os vegetais da espécie *Brassica oleracea* são amplamente consumidos em todo o
50 mundo (Girgin & El, 2015) e caracterizam-se pela considerável atividade antioxidante,
51 antimicrobiana e fitoterápica. Estas propriedades benéficas à saúde são em função da presença
52 de compostos fenólicos, flavonoides, carotenoides, vitaminas, glucosinolatos, isotiocianatos,
53 entre outros. A couve está entre os vegetais classificados como “super alimentos”, em razão
54 do alto conteúdo destes compostos (Sikora, Cieřlik, Leszczyńska, Filipiak-Florkiewicz &
55 Pisulewski, 2008; Korus, 2011a; Null & Feldman, 2011).

56 Os extratos de vegetais têm potencial para serem utilizados em produtos alimentares
57 com o objetivo de melhorar a qualidade e o valor nutritivo dos alimentos (Jaiswal, Abu-
58 Ghannam & Gupta, 2012), dessa forma, a couve apresenta teores fitoquímicos que enquadram
59 nesses objetivos.

60 A bebida láctea fermentada é um produto lácteo resultante da mistura do leite e o soro
61 de leite, fermentado mediante a ação de microrganismos específicos, na qual é possível a
62 adição de outras substâncias alimentícias. Trata-se de um produto de fácil aceitação e de

63 acesso às diferentes faixas etárias, portanto, a suplementação da bebida láctea com extrato de
64 couve trata-se de uma vertente promissora, com isso, desenvolver um produto novo com
65 compostos bioativos da couve, pois é desejo do consumidor adquirir produtos enriquecidos e
66 funcionais. Pois além da couve ser altamente nutritiva, com propriedades funcionais, é de
67 fácil acesso às populações.

68 Contudo, apesar da couve ser boa fonte de antioxidante, pode apresentar variações
69 desta característica nos diferentes estádios de desenvolvimento (Martinez-Villaluenga *et al.*,
70 2010), estádios de maturação (Korus, 2011a), sistemas de cultivo (Rigueira, Bandeira, Chagas
71 & Milagres, 2016) e após processamentos (Sikora *et al.*, 2008; Girgin & El, 2015; Murador,
72 Mercadante & Rosso, 2016; Rigueira *et al.*, 2016). Além disso, como o tipo de solvente
73 utilizado na extração tem influência considerável sobre o conteúdo de fitoquímicos e
74 atividade antioxidante e antimicrobiana, quando o objetivo é a adição dos extratos em
75 alimentos devem-se considerar solventes que não são tóxicos para o consumo humano.

76 Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial antioxidante e antimicrobiano,
77 bem como quantificar os teores de compostos fenólicos e flavonoides em extrato aquoso de
78 couve e a viabilidade da adição em bebida láctea fermentada.

79

80 **MATERIAL E MÉTODOS**

81 Coleta e preparo das amostras

82 As folhas de couve (*Brassica oleracea* var. *achephala*) cultivar manteiga foram
83 colhidas na horta experimental do Instituto de Ciências Agrárias da UFMG em Montes
84 Claros, com altitude de 630 m, latitude de 16°45'S e longitude de 43°51'W, no período de
85 fevereiro a julho de 2017 e levadas ao Laboratório de Plantas Medicinais. A triagem das
86 amostras foi realizada de maneira a selecionar folhas comercializáveis segundo os critérios de
87 Azevedo *et al.* (2014), com comprimento maior que 20 cm, sem sinais de senescência e danos
88 ocasionados por pragas e doenças. As folhas selecionadas foram higienizadas, seguindo as
89 etapas de lavagem com água corrente, sanitização em solução de 200 ppm de hipoclorito de
90 sódio por imersão durante 15 minutos e enxague com água corrente (Costa *et al.*, 2012).

91 As folhas de couve foram submetidas a quatro tratamentos. No primeiro, após a
92 higienização, cerca de 50 g de folhas foram picadas manualmente, em seguida trituradas em
93 liquidificador e foram imediatamente analisadas. No segundo tratamento as folhas também

94 frescas (50 g) foram picadas manualmente e pulverizadas em nitrogênio líquido em almofariz
95 (Ayaz *et al.*, 2008) e imediatamente analisadas.

96 Para o terceiro tratamento as folhas inteiras (200 g) foram submetidas à secagem em
97 estufa de circulação de ar a 45 °C por 72 horas, em seguida trituradas em almofariz e
98 armazenadas sob congelamento (-20 °C) por até 60 dias para as análises de atividade
99 antioxidante, dos compostos fenólicos e flavonoides. A secagem foi uma das técnicas
100 escolhidas, pois é um processo de preservação de alimentos utilizados há muitos anos em que
101 a remoção da água reduz a deterioração microbiana e enzimática, dessa forma o produto pode
102 ser armazenado por períodos longos (Korus, 2011a).

103 No quarto tratamento, cerca de 50 g das folhas higienizadas foram picadas
104 manualmente, em seguida, pulverizadas em nitrogênio líquido e armazenadas em tubos
105 Falcon sob congelamento (-20 °C) por até 60 dias para a análise da atividade antioxidante, dos
106 compostos fenólicos e flavonoides.

107

108 Preparo dos extratos

109 Para o preparo dos extratos aquosos as folhas (2,0 g) foram transferidas para
110 erlenmeyer (50 mL) e adicionado água destilada (20 mL). A escolha da água como solvente
111 se deve principalmente a não toxicidade, à facilidade de manipulação e à visão de aplicação
112 em alimentos. O recipiente foi recoberto com papel alumínio e para cada tratamento foram
113 preparadas quatro repetições. O sistema foi mantido em agitação orbital (GO shaker, SK-180-
114 Pro) a 320 rpm por uma hora e posteriormente deixado em banho ultrassônico (Sanders,
115 SoniClean 6) por 25 minutos. O extrato foi filtrado e o sobrenadante recolhido em frasco
116 âmbar, em seguida armazenou-se sob refrigeração (4 °C) até o momento da análise (adaptado
117 de Vale *et al.*, 2015).

118

119 Análise de atividade antioxidante

120 A análise de atividade antioxidante foi feita utilizando-se o radical livre DPPH (2,2-
121 difenil-1-picrihidrazil) de acordo com a metodologia de Brand-Williams, Cuvelier e Berset
122 (1995) com adaptações. Para a reação foi adicionado extrato aquoso de couve (0,2 mL) a
123 tubos de vidro contendo o radical (3,0 mL) DPPH 0,05 mM diluído em etanol. Os tubos
124 foram agitados no vórtex por 30 segundos em seguida deixados em ambiente escuro por 30
125 minutos. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (Micronal, B582) a 517
126 nm. A mistura de etanol (3,0 mL) e água destilada (0,2 mL) foi utilizada como branco.

127 A porcentagem de sequestro de radicais livres (SRL) foi calculada usando a seguinte
128 equação (Teixeira *et al.*, 2013): $SRL(\%) = ((A_{controle} - A_{amostra}) / A_{controle}) \times 100$, onde $A_{controle}$ se
129 refere à absorbância da reação controle (3,0 mL de solução de DPPH e 0,2 mL de água
130 destilada) e $A_{amostra}$ a absorbância da reação entre as amostras de extratos de couve e DPPH.

131 Foram determinados os valores de EC_{50} , ou seja, a concentração mínima necessária
132 para o extrato de couve reduzir em 50% o radical DPPH inicial da reação. Para a construção
133 da curva foram escolhidas cinco concentrações diferentes de cada tratamento, sendo para
134 folhas secas de 1,5625 a 25 g mL⁻¹ e para os outros três tratamentos de 6,25 a 100 g mL⁻¹.

135

136 Determinação de compostos fenólicos

137 Para a determinação de compostos fenólicos seguiu-se a metodologia descrita por
138 Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventós (1999). Em tubos de ensaio foram adicionados 0,5
139 mL dos extratos diluídos, em seguida adicionou-se 0,5 mL de solução de carbonato de sódio
140 (Na₂CO₃) a 7,5% (m/v) e 0,5 mL do reagente Folin Ciocalteau a 20% (v/v), após isso os tubos
141 foram tampados, agitados em vórtex por um minuto e deixados em repouso por 30 min em
142 ambiente escuro, em seguida procedeu-se a leitura da absorbância no comprimento de onda de
143 765 nm. Para cada tratamento foram feitas quatro repetições em quadruplicata. Para expressão
144 dos resultados construiu-se uma curva de calibração de ácido gálico (Sigma-Aldrich) nas
145 concentrações de 0, 0,005, 0,01, 0,02, 0,04 mg mL⁻¹ ($R^2=0,99$), dessa forma, os resultados
146 foram expressos em mg EAG/g peso seco. Utilizou-se a água destilada como solvente para as
147 soluções de carbonato de sódio, Folin Ciocalteau e ácido gálico. As amostras foram diluídas
148 sempre que necessário de forma a atender os limites da curva padrão.

149

150

151 Determinação de flavonoides

152 A determinação de flavonoides foi realizada conforme a metodologia descrita por
153 Dewanto, Wu, Adom e Liu (2002). Em tubos de ensaio foram adicionados 250 µL do extrato
154 ou padrão, 1250 µL de água destilada e 75 µL de solução de nitrito de sódio (NaNO₂) a 5%
155 (m/v), em seguida o sistema foi mantido em repouso para reação por seis minutos, após esse
156 tempo adicionou-se 150 µL de solução de cloreto de alumínio (AlCl₃) a 10% (m/v) e
157 permaneceu por mais cinco minutos em repouso, em seguida foram adicionados 500 µL de
158 solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1M e completou-se o volume até 2,5 mL com água
159 destilada, na sequencia os tubos foram agitados em vórtex e foi feita a leitura da absorbância a

160 510 nm em espectrofotômetro. Para cada tratamento foram feitas quatro repetições em
161 quadruplicata.

162 Para expressão dos resultados construiu-se curvas de calibração de catequina
163 (Greenselect Phytosome, 88,88% de pureza) nas concentrações de 100, 200, 300, 400 e 500
164 µg/mL e de quercetina (Sigma-Aldrich) nas concentrações de 50, 100, 200, 300 e 400 µg/mL
165 ($R^2=0,99$) dessa forma, os resultados foram expressos em mg EC/g peso seco e mg EQ/g peso
166 seco. Utilizou-se a água destilada como solvente para as soluções de nitrito de sódio, cloreto
167 de alumínio, hidróxido de sódio e dos padrões catequina e quercetina.

168

169 Triagem da atividade antibacteriana

170 Utilizou-se o método de difusão em placas em discos de papel, no qual foi baseado na
171 metodologia proposta pelo CLSI (2015) com alterações. As bactérias patogênicas
172 *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Escherichia coli* ATCC 8759 e *Salmonella*
173 *choleraesuis* ATCC 10708 foram suspensas em solução salina estéril e a turvação foi
174 comparada com o padrão 0,5 da escala de McFarland. Foi inoculado cerca de 15 µL dessa
175 suspensão em placas de Petri contendo meio de cultura ágar nutriente Mueller Hinton.

176 Em seguida foram colocados nestas placas de Petri discos de papel filtro de 6 mm de
177 diâmetro impregnados com 30 µL de extrato de couve dos quatro tratamentos na concentração
178 de 100 mg.mL⁻¹. Em seguida, incubaram-se as placas do antibiograma à temperatura de 37°C
179 por um período de 24 horas. Após a incubação, os halos de inibição foram medidos. Foram
180 feitas três repetições de cada bactéria.

181

182 Produção da bebida láctea fermentada com extrato de couve

183 Para a produção da bebida láctea fermentada foram utilizados os seguintes
184 ingredientes: Leite UHT integral, soro de leite em pó, água mineral, açúcar, fermento lácteo
185 composto por *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus* (Crs.
186 Hansen), espessante amido modificado e o extrato de couve. A bebida foi produzida com a
187 relação de 75% de leite e 25% de soro de leite, essa proporção foi escolhida para atingir os
188 limites mínimos de proteínas (1,7g/100g) e matéria gorda (2g/100g) de origem láctea
189 (BRASIL, 2005).

190 Para preparo do extrato de couve foi escolhido o tratamento que apresentou resultados
191 satisfatórios nas análises de atividade antioxidante, determinação de fenólicos e flavonoides
192 em função do extrato. O extrato foi preparado na concentração de 0,1 g mL⁻¹ e além das
193 etapas já citadas no preparo o extrato foi micro filtrado (0,22µm) com o objetivo de

194 esterilização e foi adicionado na bebida nas proporções de 5, 10 e 15% (v/v). Para o controle
195 positivo foi utilizado o conservante sorbato de potássio concentração de 0,03 (3,0% m/v)
196 conforme o limite estabelecido pelo Regulamento técnico de identidade e qualidade de bebida
197 láctea (Brasil, 2005).

198 Para o processo de produção da bebida láctea fermentada seguiu-se a metodologia
199 descrita por EPAMIG (2010), no qual o tempo de fermentação foi baseado na descrição do
200 fabricante do fermento lácteo e em medições do pH até chegar em 4,6. Foi feita, além da
201 bebida experimental com extrato de couve, a bebida controle com adição do conservante
202 sorbato de potássio. As bebidas foram acondicionadas em embalagens plásticas identificadas
203 e armazenadas sob refrigeração a temperatura de 5 °C, aproximadamente. Foram feitas as
204 análises microbiológicas e antioxidantes nas bebidas após a fabricação.

205

206 Análise da atividade antioxidante da bebida láctea fermentada

207 A análise de atividade antioxidante da bebida láctea fermentada foi feita utilizando-se
208 o radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrihidrazil, Sigma-Aldrich) de acordo com a
209 metodologia de Brand-Williams *et al.* (1995) com adaptações de Skrede, Larsen, Aaby,
210 Jørgensen e Birkeland (2004).

211 Primeiramente as bebidas foram diluídas em metanol na proporção 1:0,5. Em seguida,
212 em triplicata, foram colocados 100 µL das amostras diluídas ou metanol (controle) em tubos
213 Falcon e adicionou-se 3,9 mL do radical DPPH (0,0277 g DPPH/L metanol). A mistura foi
214 deixada em ambiente escuro por 30 minutos e depois centrifugada a 4000 rpm por 10 min.
215 Após isso, procedeu-se a leitura da absorbância do sobrenadante em espectrofotômetro a 515
216 nm, utilizando-se o metanol como branco.

217

218 Contagem de bactérias lácticas da bebida láctea fermentada

219 Em todas as bebidas produzidas foram feitas as contagens de bactérias lácticas. Foi feita
220 a primeira diluição com 25 mL de amostra em 225 mL de solução salina peptonada 0,1%
221 (p/v) e homogeneização. A partir da diluição inicial (10^{-1}), foram feitas as demais diluições
222 utilizando a solução diluente citada acima. Foi inoculada cada diluição desejada no meio
223 MRS Agar (De Man, Rogosa e Sharpe), as placas foram incubadas a 37°C por 48 horas, após
224 isso, procedeu-se a contagem das bactérias lácticas (ISO 7889, 2003).

225

226 Análise estatística

227 O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com quatro repetições e os
 228 resultados foram analisados pelo método de análise de variância e as médias comparadas pelo
 229 teste de Tukey ao nível de significância de 5% utilizando o *software* estatístico R e o pacote
 230 ExpDes.pt.

231

232 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

233 Atividade antioxidante, compostos fenólicos e flavonoides

234 Quanto à atividade antioxidante, as folhas recém-colhidas submetidas às técnicas de
 235 trituração em liquidificador e pulverização em nitrogênio líquido não se diferiram
 236 estatisticamente (Tabela 1). Isso demonstra que, neste caso, as diferenças no tamanho de
 237 partículas das folhas (triturada>pulverizada), bem como a rápida inibição da atividade
 238 enzimática pela baixa temperatura do nitrogênio não foram suficientes para influenciar na
 239 capacidade de sequestro de DPPH.

240

241 **Tabela 1-** Atividade antioxidante, EC50, teor de compostos fenólicos e flavonoides em
 242 extrato aquoso de couve

Tratamentos	Atividade antioxidante (%)	EC50 (mg/mL)	Compostos fenólicos (mgEAG/g peso seco)	Flavonoides	
				mgECatequi na/g peso seco	mgEQuerceti na/g peso seco
Folhas secas	78,75 ± 4,79 a	10,00	43,53 ± 3,87 a	26,00 ± 2,70b	14,59 ± 1,61 b
Folhas congeladas	71,20 ± 2,06 a	43,80	42,94 ± 9,11 a	23,76 ± 2,06b	11,53 ± 1,24 b
Folhas frescas pulverizadas	63,16 ± 5,12 b	61,77	40,22 ± 3,76 ab	49,27 ± 8,27a	26,83 ± 4,96 a
Folhas frescas trituradas	62,04 ± 0,91 b	76,15	29,89 ± 2,73 b	19,91 ± 0,82b	9,22 ± 0,49 b

243 Letras iguais nas colunas não se diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de
 244 significância.

245

246 As porcentagens de inibição do radical DPPH pelas folhas frescas deste estudo estão
 247 de acordo com as encontradas por Korus (2011a) que obteve valores na faixa de 40,7 a 65,5%
 248 para couve fresca. Nossos resultados também corroboram com Rigueira *et al.* (2016) os quais

249 verificaram em folhas couve manteiga não processadas valores de 68,6%. Entretanto, as
250 porcentagens de SRL das folhas frescas estão abaixo da encontrada por Melo *et al.* (2006) em
251 folhas de couve crua que apresentou valor de 90,49%, apesar que essa porcentagem não se
252 diferiu de 60,16% (alface crespa). Salienta-se que, os estudos de Rigueira *et al.* (2016) e Melo
253 *et al.* (2006) utilizaram metanol e etanol como solventes. Já no presente estudo utilizou-se
254 água destilada. Como o tipo de solvente utilizado na extração tem influência direta na
255 composição fitoquímica do extrato, portanto, exerce influencia também no potencial
256 antioxidante (Jaiswal *et al.*, 2012; Begum & Poonkothai, 2013).

257 Estudos relatam que vegetais e hortaliças submetidas a diferentes técnicas de
258 processamento podem sofrer alterações em seu potencial antioxidante (Sikora *et al.*, 2008;
259 Rigueira *et al.*, 2016). Bem como, o uso de diferentes tipos de solventes influencia sobre o
260 conteúdo de fitoquímicos extraídos, e conseqüentemente na atividade antioxidante e na
261 atividade antimicrobiana. Devido ao propósito de adicionar extratos em alimentos, o ideal é a
262 escolha de solventes não tóxicos e que seja de fácil manipulação, portanto, a água atende a
263 estes requisitos, contudo, deve se saber a sua eficácia na extração.

264 As folhas frescas trituradas e as frescas pulverizadas deste estudo, segundo
265 classificação de Melo *et al.* (2006), demonstraram ter moderada capacidade de sequestro do
266 DPPH por ter valores de 60 a 70%. É importante lembrar que a condição das folhas frescas
267 trituradas se assemelha ao suco de couve, triturado em liquidificador com água.

268 As folhas secas apresentaram o maior valor numérico de atividade antioxidante, mas
269 não se diferiram das folhas congeladas (Tabela 1). Outros trabalhos também verificaram
270 aumento da AAT em função da aplicação do calor, como os dados de Rigueira *et al.* (2016)
271 com a aplicação de calor seco (fritura por 3 min) em folhas de couve, bem como, Murador *et*
272 *al.* (2016) e Girgin e El (2015) observaram aumento de 186,9% em couve e 39% em couve-
273 flor, respectivamente, na atividade antioxidante com o cozimento a vapor em relação aos
274 vegetais crus.

275 Este aumento da atividade antioxidante em função do calor em folhas frescas pode ser
276 devido a diversos fatores, como a degradação de compostos, levando à variação no conteúdo e
277 composição dos fenólicos (Murador *et al.*, 2016) e ruptura dos componentes celulares,
278 favorecendo a liberação de compostos antioxidantes (Girgin & El, 2015). Pode ser também
279 devido aos produtos da reação de Maillard formados durante o tratamento, que possuem ação
280 antioxidante (Santos, Batista, Duarte, Abreu & Gouvêa, 2007). Ou simplesmente pela
281 secagem favorecer a concentração dos compostos antioxidantes devido a menor quantidade de
282 água em relação aos vegetais frescos.

283 Os resultados das folhas secas estão próximos aos encontrados por Rigueira *et al.*
284 (2016) quando analisaram folhas de couve manteiga submetidas ao calor seco e apresentaram
285 capacidade de inibição de DPPH de 72,5% a 86,9%. E são inferiores aos encontrados por
286 Melo, Maciel, Lima e Santana (2009) em espinafre, cenoura, couve e couve-flor cozidos a
287 vapor, que com 30 min de reação entre o extrato de couve e o radical DPPH, encontraram
288 valores de 85% a 90%.

289 As folhas congeladas, assim como as folhas secas, apresentaram os melhores
290 resultados no sequestro do radical DPPH (71,20%). Estudos evidenciam a estabilidade
291 antioxidante durante o congelamento, como é o caso de frutos de amora-preta com até 60 dias
292 de armazenamento, com variação de 80,55 a 77,94% de inibição do DPPH (Haida *et al.*,
293 2014), néctar de amora-preta em que a % de inibição variou de 75,89 a 70,12 do tempo 0 até
294 90 dias de armazenamento, portanto evitou que os compostos funcionais fossem altamente
295 degradados (Araújo, Rodrigues, Machado, Santos & Silva, 2009) e em suco de tangerina,
296 inclusive com aumento de 4,26% com 120 dias de armazenamento (Moreira, Lopes &
297 Valente-Mesquita, 2012).

298 A partir dos valores de absorvância das diferentes concentrações dos extratos em
299 reação com o DPPH foram feitos os cálculos da EC₅₀ para os tratamentos (Tabela 1), sendo
300 que quanto menor a EC₅₀ maior é a atividade antioxidante, por tanto houve uma relação destes
301 valores com a atividade antioxidante. Esses valores estão próximos ao encontrado por
302 Armesto, Gómez-Limia, Carballo e Martínez (2016) em folhas de couve cozidas por fervura
303 (22,50 mg mL⁻¹), e apresentaram menor rendimento que os encontrados por Jaiswal *et al.*
304 (2012) para brócolis e repolho, que variaram de 0,71 a 1,41 mg mL⁻¹ dependendo do solvente
305 e menor que folhas de couve-flor com valor de 2,27 mg·mL⁻¹ (Bhandari & Kwak, 2015).
306 Conhecer a capacidade antioxidante dos alimentos pode ajudar nas pesquisas que avaliam a
307 ingestão e o planejamento dietético para o aumento do consumo de antioxidantes (Wachtel-
308 Galor, Wong & Benzie, 2008).

309 Observou-se que nos extratos de folhas secas nas concentrações de 25 e 100 mg·mL⁻¹,
310 após a reação com o radical DPPH, houve formação de precipitado, sendo que quanto maior a
311 concentração maior o precipitado. Não foram vistos relatos sobre isso na literatura, então
312 acredita-se que a formação do precipitado esteja relacionada com a maior concentração de
313 sólidos nas folhas.

314 O interesse nutricional da couve está, na maioria das vezes, relacionado aos seus
315 compostos fenólicos, pois esta é geralmente rica em polifenóis e entre suas propriedades para
316 a saúde humana, uma das mais importantes é a atividade antioxidante (Cartea, Francisco,

317 Soengas & Velasco, 2001). As folhas secas, congeladas e frescas pulverizadas não diferiram
318 estatisticamente quanto aos compostos fenólicos (Tabela 1). Já as folhas frescas trituradas
319 apresentaram menor teor de fenólicos, mas não se diferiram das frescas pulverizadas
320 ($p>0,05$). Antes de transformar os valores para a unidade de mg EAG/g peso seco, obtiveram-
321 se os dados de mg EAG/mL de extrato, quando foi visto que o extrato com folhas secas
322 apresentaram o teor de fenólicos cerca de 10 vezes maior ($4,06 \pm 0,36$ mg EAG/mL de
323 extrato) que os outros tratamentos.

324 Estes resultados estão acima dos observados por Naguib *et al.* (2012) que encontraram
325 valores de 7,68 a 13,82 mg EAG/g peso seco ao avaliarem o efeito de fertilizantes orgânicos
326 em duas cultivares de brócolis. E acima dos encontrados para a couve Galega (13,18 mg
327 EAG/g peso seco) (Oliveira, Ramos, Brandão & Silva, 2015) e pra couve Curly armazenada
328 de 0 a 6 semanas sob refrigeração (16,67 a 17,50 mg EAG/g peso seco) (Hagen, Borge,
329 Solhaugb & Bengtsson, 2009). Contudo, estes teores estão abaixo dos encontrados por
330 Bhandari e Kwak (2015) para couve-flor e brócolis e por Korus (2011b) para couve crua e
331 branqueada. E estão de acordo com Armesto *et al.* (2016) em couve Galega crua.

332 O tratamento térmico e conseqüentemente a desidratação não mostrou alterações
333 significativas do teor de fenólicos totais em relação às folhas frescas (pulverizadas). Este
334 comportamento foi semelhante ao observado por Fiol *et al.* (2013) que submeteram três
335 cultivares de couve a 100 °C durante duas e quatro horas, sendo que o teor de fenólicos não se
336 diferiram entre as amostras cozidas e a couve crua. Como justificativa, os autores ressaltam
337 que a degradação simultânea de alguns compostos resulta em um aumento de outros
338 compostos ou substâncias neoformadas o que compensa a perda de componentes fenólicos e,
339 portanto, não houve alteração do conteúdo fenólico total (Fiol *et al.*, 2013).

340 O maior teor de compostos fenólicos em folhas congeladas, comparando-se com as
341 folhas frescas trituradas está de acordo com Alanís-Garza, Becerra-Moreno, Mora-Nieves,
342 Mora-Mora e Jacobo-Velázquez (2015) que avaliaram o efeito do congelamento industrial (-
343 20 °C), portanto a mesma temperatura do presente trabalho, sobre a estabilidade de moléculas
344 bioativas em sete cultivares comerciais de brócolis. Como resultados, os fenóis totais
345 permaneceram constantes na maioria das cultivares e em algumas foram observados ligeiro
346 aumento. O que sugere que os compostos bioativos em brócolis congelados seriam mais bio-
347 disponíveis do que no vegetal cru (Alanís-Garza *et al.*, 2015), o que corrobora com nossos
348 achados.

349 Portanto, o congelamento de vegetais pode levar ao desenvolvimento de cristais de
350 gelo dentro da matriz da planta, e esses cristais podem afetar a estrutura das membranas

351 celulares, induzindo modificações em sua permeabilidade, melhorando o processo de extração
352 dos compostos (Alanís-Garza *et al.*, 2015). Além disso, estudos relatam que o congelamento
353 leva a maior retenção de polifenóis, como parte da resposta das plantas ao estresse causado
354 pela baixa temperatura (Sikora *et al.*, 2008). Consoante a isso, em trabalho feito por Simões,
355 Moreira, Mosquim, Soares e Puschmann (2015) foi visto que a baixa temperatura (5°C)
356 retardou reações enzimáticas (fenilalanina amônia-liase, peroxidase e polifenoloxidase) e
357 mudanças no metabolismo fenólico e esses resultados mostram a importância da temperatura
358 para manter a qualidade da couve inteira e minimamente processada.

359 No presente estudo, as folhas antes de serem congeladas foram submetidas à
360 pulverização em nitrogênio líquido, portanto, pode ter havido inibição de enzimas da couve,
361 que podem influenciar no metabolismo fenólico, além da ruptura da membrana celular o que
362 poderia aumentar a extratibilidade dos compostos. As folhas frescas pulverizadas também
363 passaram por esses processos de nitrogênio líquido e de ruptura da membrana através da
364 pulverização, o que pode justificar seus teores próximos, resultando em maior acessibilidade
365 dos compostos ao solvente de extração, pois os compostos fenólicos são hidrossolúveis.

366 Não foi significativa ($p>0,05$) a correlação entre a atividade antioxidante e o teor de
367 fenólicos ($R=0,7372$), as folhas frescas pulverizadas apresentaram menor poder antioxidante
368 que as folhas secas e congeladas, mas não diferiram desses tratamentos em relação aos
369 compostos fenólicos, isso se dá porque os fenólicos não são os únicos componentes que
370 influenciam na atividade antioxidante. Os estudos revelam que a capacidade antioxidante das
371 espécies *Brassica oleracea* está relacionada com o conteúdo e a composição dos fenólicos,
372 flavonoides, antocianinas, luteínas, vitamina C e ácidos neoclorogênicos (Sikora *et al.*, 2008;
373 Soengas, Cartea, Francisco, Sotelo & Velasco, 2012; Kaulmann, Jonville, Schneider,
374 Hoffmann & Bohn, 2014).

375 Dentre os compostos fenólicos, flavonoides e ácidos fenólicos são os grupos mais
376 caracterizados em Brassica. Os flavonoides protegem as plantas contra a radiação UV,
377 microrganismos patogênicos, insetos e animais que se alimentam de plantas, além disso,
378 reagem como antioxidantes na defesa contra espécies reativas de oxigênio (ROS) (Neugart *et*
379 *al.*, 2013; Park *et al.*, 2014). As folhas secas, congeladas e frescas trituradas não se diferiam
380 estatisticamente quanto ao teor de flavonoides (Tabela 1), portanto, a aplicação do calor bem
381 como a baixa temperatura às folhas de couve fornecem extratos com altos teores de fenólicos,
382 porém baixas quantidades de flavonoides. E a trituração utilizando o liquidificador
383 apresentou-se como uma técnica ineficiente para a extração de ambos os compostos. Já as
384 folhas frescas pulverizadas em nitrogênio líquido, características por terem menor tamanho de

385 partícula e rápida inibição enzimática, forneceram extratos com maior teor de flavonoides
386 (26,83 mg EQ/g peso seco e 49,27 mg EC/g peso seco).

387 Situação semelhante foi encontrada por Bhandari e Kwak (2015) ao analisarem couve-
388 flor e brócolis, verificaram que o teor de fenóis totais foi maior nas inflorescências, enquanto
389 que o conteúdo total de flavonoides foi maior no tecido foliar, ou seja, não houve uma
390 correlação significativa entre fenólicos e flavonoides. No presente estudo não houve
391 correlação significativa ($p>0,05$) entre os flavonoides e a atividade antioxidante ($R=-$
392 $0,21883$), bem como flavonoides e compostos fenólicos ($R=0,3438$). As folhas secas,
393 congeladas e frescas pulverizadas apresentaram maior teor de compostos fenólicos. Já o maior
394 teor de flavonoides foi apresentado nas folhas frescas pulverizadas. Os resultados de
395 correlações não significativas encontradas neste estudo podem ser em função da utilização de
396 poucos tratamentos (quatro) e, portanto gerou baixo graus de liberdade do resíduo. Com isso,
397 são necessários maior grau de liberdade do resíduo para explicar biologicamente a real
398 correlação entre os componentes.

399 Os resultados encontrados para os teores de flavonoides estão de acordo com os
400 encontrados por Bhandari e Kwak (2015) em brócolis e couve-flor e também corroboram com
401 os achados por Naguib *et al.* (2012) para brócolis. Antes de transformar os valores para a
402 unidade de mg/g peso seco, obteve-se os dados de mg/mL de extrato, foi visto que o extrato
403 com folhas secas apresentaram o teor de flavonoides (1,37 mg EQ/mL de extrato e 2,43 mg
404 EC/mL de extrato) cerca de 10 vezes maior que os tratamentos folhas congeladas e frescas
405 trituradas e cerca de cinco vezes maior que as folhas pulverizadas.

406 Para as folhas secas e congeladas, armazenadas por até 60 dias para a análise de
407 flavonoides, pode ter havido competição na produção de outros compostos fenólicos, grande
408 grupo no qual os flavonoides pertencem, pois em estudo com repolho Park *et al.* (2014)
409 afirmaram que com base nas vias biossintéticas, os ácidos fenólicos tiveram uma relação
410 competitiva com antocianidinas e flavonóis.

411 Neste estudo as folhas de couve foram analisadas quanto às técnicas de trituração e de
412 conservação. A utilização de água como solvente e a concentração de $0,1 \text{ g.mL}^{-1}$ (ou 100
413 mg.mL^{-1}) em folhas de couve obteve-se resultados satisfatórios de atividade antioxidante,
414 compostos fenólicos e flavonoides. Esse fato tem alta relevância, principalmente no que se
415 refere a possível adição desses extratos em alimentos como enriquecimento do potencial
416 antioxidante.

417

418 Atividade antimicrobiana dos extratos de couve

419 Não houve formação de halo de inibição de nenhum dos extratos aquosos de couve
420 analisados frente às bactérias *S. aureus*, *E. coli* e *Salmonella*. Esses resultados não
421 corroboram com outros trabalhos que encontraram ação antimicrobiana em vegetais da
422 espécie *Brassica oleracea* utilizando extrato aquoso, como Sousa *et al.* (2008), Begum e
423 Poonkothai (2013) e Vale *et al.* (2015). Em ambos os trabalhos houve a concentração do
424 extrato, seja por liofilização ou por aquecimento, entre outras etapas que não foram utilizadas
425 nesta pesquisa. Além das condições experimentais, a não inibição pode ter se dado devido a
426 fatores relacionados com as folhas analisadas, como a cultivar selecionada, solo, clima da
427 região e cultivo. Pois o sistema de cultivo (convencional e orgânico) e o processamento (calor
428 seco e úmido) interferem diretamente na composição química do vegetal (Rigueira *et al.*,
429 2016) e os solventes utilizados na extração também influenciam na recuperação dos
430 metabólitos secundários (Begum & Poonkothai, 2013). Demais estudos devem ser realizados
431 diversificando a concentração dos extratos e a maneira de extração desses compostos.

432 Em pesquisa realizada por Cavalheiro *et al.* (2009) também não foi observada ação
433 antimicrobiana dos extratos aquosos. De forma geral foi observado na literatura que a água
434 possui menor eficácia na extração de compostos antimicrobianos, como Alvarenga, Schwan,
435 Dias, Schwan-Estrada e Bravo-Martins (2007) observaram que não houve ação antibacteriana
436 dos extratos aquosos, independente da concentração (10 e 20%) sobre nenhum dos
437 microrganismos pesquisados, já os extratos etanólicos (20%) inibiram parcialmente o
438 crescimento de *Shigella flexneri*. E Degáspari, Waszczyński e Prado (2005) verificaram que
439 o extrato alcoólico de frutos da *Schinus terebenthifolius* apresentou efeito inibitório sobre o
440 crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*, já o extrato aquoso não apresentou
441 efeito inibitório sobre os microrganismos testados.

442 Diante disso, as folhas de couve estudadas nesta pesquisa e submetidas a estas técnicas
443 de extração não apresentaram ação antimicrobiana. Portanto, novos trabalhos devem ser
444 feitos, estudando outras cultivares e metodologias de extração.

445

446 Bebida láctea fermentada adicionada de extrato aquoso de couve

447 Os extratos aquosos das folhas de couve submetidas à técnica de secagem
448 apresentaram melhores resultados de atividade antioxidante, EC50, compostos fenólicos e
449 flavonoides (em função do extrato) dessa forma este tratamento foi escolhido para adição na
450 bebida láctea fermentada. A bebida láctea com 15% de extrato e a bebida com 15% + sorbato

451 não diferiram estatisticamente e apresentaram maior atividade antioxidante (Tabela 2).
 452 Portanto, a atividade antioxidante da bebida controle (11,65%) é em função dos ingredientes
 453 leite e soro, Ribeiro *et al.* (2014) verificaram atividade antioxidante de quase 5% em leite
 454 fermentado e as proteínas do soro de leite e seus produtos metabólicos são antioxidantes e
 455 sequestrantes de radicais livres (Sgarbieri, 2004). Neste caso, a adição do aditivo sorbato de
 456 potássio não exerceu efeito antioxidante na bebida. Dessa forma, a bebida láctea fermentada
 457 já possui o potencial antioxidante e a adição de 15% do extrato aquoso de folha de couve seca
 458 aumentou mais de três vezes este potencial.

459

460 **Tabela 2** – Atividade antioxidante e contagem de bactérias lácticas das bebidas lácteas
 461 fermentadas com adição de extrato aquoso de couve e do controle

Tratamentos	Atividade antioxidante (%)	BAL (UFC/mL)
Bebida 5%	26,83 ± 2,57b	2,13 x 10 ⁷
Bebida 10%	28,34 ± 2,70b	> 10 ⁷
Bebida 15%	36,82 ± 3,37a	> 10 ⁷
Bebida 15% com Sorbato	36,32 ± 5,27a	3,7 x 10 ⁶
Bebida Sorbato (controle)	11,65 ± 1,90c	1,49 x 10 ⁷

462 BAL: bactérias ácido lácticas. Letras iguais não se diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5%
 463 de significância

464

465 Não houve diferença na atividade antioxidante entre as bebidas adicionadas com 5% e
 466 10% de extrato de couve, mas ainda sim foram 2,3 e 2,4 vezes maior que o controle,
 467 respectivamente. Biegańska-Marecik, Radziejewska-Kubzdela e Marecik (2017) adicionaram
 468 couve (cultivar curly) congelada e liofilizada em uma bebida à base de suco de maçã e
 469 observaram que a adição desses tratamentos causou aumento significativo de 2,7 e 3,3 vezes
 470 do teor de compostos fenólicos, 3,5 e 3,3 vezes dos flavonoides e aumento de 56% e 121% da
 471 atividade antioxidante, respectivamente

472 Quanto à contagem de bactérias lácticas, as bebidas acrescentadas do extrato em 5%,
 473 10%, 15% e 15% com sorbato apresentaram contagens de bactérias lácticas acima de 10⁶
 474 UFC/mL (Tabela 2), portanto estão de acordo com a legislação vigente (Brasil, 2005). Com
 475 isso, a presença do extrato na bebida não inibiu o crescimento dessas bactérias, pois não
 476 diferiram do controle, corroborando com o estudo anterior de atividade antimicrobiana dos

477 extratos de couve, dessa forma não influenciou na principal etapa da produção dessa bebida
478 que é a fermentação.

479 Portanto, o extrato aquoso de couve é um ingrediente promissor tanto para o alimento
480 como para o consumidor, devido ao fato que inibirá a oxidação da bebida bem como trata-se
481 de um alimento enriquecido com compostos bioativos da couve e com atividade antioxidante
482 aumentada, sendo que a bebida com 15% de adição apresentou melhor performance
483 antioxidante

484

485 **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

486 A aplicação do calor bem como a baixa temperatura às folhas de couve fornecem
487 extratos com alta atividade antioxidante, altos teores de fenólicos, porém baixas quantidades
488 de flavonoides. Folhas frescas pulverizadas em nitrogênio líquido fornecem extratos com
489 maior teor de flavonoides. Não há ação antimicrobiana dos extratos aquosos de couve frente
490 às bactérias *S. aureus*, *E. coli* e *Salmonella*. Demais estudos devem ser realizados
491 diversificando a concentração dos extratos e maneira de extração desses compostos.

492 A utilização de água como solvente e a concentração de $0,1 \text{ g mL}^{-1}$ em folhas de couve
493 obteve-se resultados satisfatórios de atividade antioxidante, compostos fenólicos e
494 flavonoides. O extrato aquoso de couve é promissor para adição em bebida láctea fermentada,
495 pois pode inibir a oxidação da bebida sem interferir no processo de fermentação.

496 Devido à demanda por alimentos funcionais, esses extratos também podem ser
497 adicionados em outros alimentos pobres em atividade antioxidante. Estudos posteriores
498 devem ser feitos para aceitação sensorial da bebida láctea fermentada suplementada com
499 extrato de couve.

500

501

REFERÊNCIAS

502 Alanís-Garza, P. A. Becerra-Moreno, A., Mora-Nieves, J. L., Mora-Mora, J. P., & Jacobo-
503 Velázquez, D. A. (2015). Effect of industrial freezing on the stability of chemopreventive
504 compounds in broccoli. *International Journal Food Sciences and Nutrition*, 66(3), 282–288.

505 Alvarenga, A. L., Schwan, R. F., Dias, D. R., Schwan-Estrada, K. R. F., & Bravo-Martins, C.
506 E. C. (2007). Atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre bactérias patogênicas
507 humanas. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 9(4), 86-91.

508 Araújo, P. F., Rodrigues, R. S., Machado, A. R. Santos, V. S., & Silva, J. A. (2009).
509 Influência do congelamento sobre as características físico-químicas e o potencial antioxidante
510 de néctar de amora-preta. *Boletim CEPPA*, 27(2), 199-206.

511 Armesto, J., Gómez-Limia, L., Carballo, J., & Martínez, S. (2016). Effects of different
512 cooking methods on some chemical and sensory properties of Galega kale. *International*
513 *Journal of Food Science and Technology*, 51, 2071–2080.

514 Ayaz, F. A., Hayırlıoğlu-Ayaz, S., Alpaya-Karaoğlu, S., Grúz, J., Valentová, K., Ulrichová, J.,
515 & Strnad, M. (2008). Phenolic acid contents of kale (*Brassica oleraceae* L. var. *acephala*
516 DC.) extracts and their antioxidant and antibacterial activities. *Food Chemistry*, 107, 19-25.

517 Azevedo, A. M., Andrade Júnior, V. C., Fernandes, J. S. C., Pedrosa, C. E., Valadares, N. R.,
518 Ferreira, M. A. M., & Martins, R. A. V. (2014). Divergência genética e importância de
519 caracteres morfológicos em genótipos de couve. *Revista Horticultura Brasileira*, 32(1), 48-54.

520 Begum, A. R., & Poonkothai, M. (2013). In vitro antimicrobial activity and phytochemical
521 analysis of *Brassica oleracea*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical*
522 *Sciences*, 5(2), 405-408.

523 Bhandari, S. R., & Kwak, J.-H. (2015). Chemical composition and antioxidant activity in
524 different tissues of Brassica vegetables. *Molecules*, 20(1), 1228-1243.

525 Biegańska-Marecik, R., Radziejewska-Kubzdela, E., & Marecik, R. (2017). Characterization
526 of phenolics, glucosinolates and antioxidant activity of beverages based on apple juice with
527 addition of frozen and freeze-dried curly kale leaves (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* L.).
528 *Food Chemistry*, 230(1), 271–280.

529 Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to
530 evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.

531 Brasil. (2005). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n°
532 16, de 23 de agosto de 2005. Regulamento técnico de identidade e qualidade de bebida láctea.
533 *Diário Oficial da União – D.O.U. Brasília, DF, 24 ago. 2005.*

534 Cartea, M. E., Francisco, M., Soengas, P., & Velasco, P. (2011). Phenolic compounds in
535 *Brassica* vegetables. *Molecules*, 16, 251-280.

536 Cavalleiro, M. G., Farias, D. F., Fernandes, G. S., Nunes, E. P., Cavalcanti, F. S.
537 Vasconcelos, I. M., ... Carvalho, A. F. U. (2009). Atividades biológicas e enzimáticas do
538 extrato aquoso de sementes de *Caesalpinia ferrea* Mart., Leguminosae. *Brazilian Journal of*
539 *Pharmacognosy*, 19(2B), 586-591.

540 CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2015). *Methods for Dilution*
541 *Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard*
542 *— Ninth Edition*. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards
543 Institute.

544 Costa, E. D. A., Figueiredo, E. A. T., Chaves, C. S., Almeida, P. C., Vasconcelos, N. M.,
545 Magalhães, I. M. C., ... Paixão, L. M. N. (2012). Avaliação microbiológica de alfaces (*Lacuta*
546 *sativa* L.) convencionais e orgânicas e a eficiência de dois processos de higienização. *Revista*
547 *Alimentos e Nutrição*, 23(3), 387-392.

548 Degáspari, C. H., Waszczyński, N., Prado, M. R. M. (2005). Atividade antimicrobiana de
549 *Schinus terebenthifolius* Raddi. *Ciência e Agrotecnologia*, 29(3), 619-622.

550 Dewanto, V., Wu, X., Adom, K. K., & Liu, R. H. (2002). Thermal processing enhances the
551 nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal of Agricultural*
552 *and Food Chemistry*, 50, 3010-3014.

553 Fiol, M., Weckmüller, A., Neugart, S., Schreiner, M., Rohn, S., Krumbein, A., & Kroh, L. W.
554 (2013). Thermal-induced changes of kale's antioxidant activity analyzed by HPLC–UV/Vis-
555 online-TEAC detection. *Food Chemistry*, 138, 857–865.

556 Girgin, N., & El, S. N. (2015). Effects of cooking on in vitro sinigrin bioaccessibility, total
557 phenols, antioxidant and antimutagenic activity of cauliflower (*Brassica oleraceae* L. var.
558 *Botrytis*). *Journal of Food Composition and Analysis*, 37(1), 119-127.

559 Hagen, S. F., Borge, G. I. A., Solhaug, K. A., & Bengtsson, G. B. (2009). Effect of cold
560 storage and harvest date on bioactive compounds in curly kale (*Brassica oleracea* L. var.
561 *acephala*). *Postharvest Biology and Technology*, 51, 36–42.

562 Haida, K. S., Silva, F. J., Coelho, S. R. M., Lima, D. S., Abrão, R. M., & Haida, K. (2014).
563 Caracterização físico-química e atividade antioxidante de amoreira-preta (*Morus nigra* L.).
564 *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*, 12(40), 21-28.

565 ISO 7889. (2003). Yogurt - Enumeration of characteristics microorganisms - Colony count
566 technique at 37 °C. International Standard Organization, Geneva, Switzerland, 2003.
567 Disponível em: <<https://www.evs.ee/products/iso-7889-2003>>. Acesso em: 06 nov. 2017.

568 Jaiswal, A. K., Abu-Ghannam, N., & Gupta, S. (2012). A comparative study on the
569 polyphenolic content, antibacterial activity and antioxidant capacity of different solvent
570 extracts of *Brassica oleracea* vegetables. International Journal of Food Science and
571 Technology, 47(1), 223-231.

572 Kaulmann, A., Jonville, M.-C., Schneider, Y.-J., Hoffmann, L., & Bohn, T. (2014).
573 Carotenoids, polyphenols and micronutrient profiles of Brassica oleraceae and plum varieties
574 and their contribution to measures of total antioxidant capacity. Food Chemistry, 155, 240-
575 250.

576 Korus, A. (2011a). Level of vitamin C, polyphenols, and antioxidant and enzymatic activity in
577 three varieties of kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) at different stages of maturity.
578 International Journal of Food Properties, 14(1), 1069-1080.

579 Korus, A. (2011b). Effect of preliminary processing, method of drying and storage
580 temperature on the level of antioxidants in kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) leaves.
581 LWT - Food Science and Technology, 44(1), 1711-1716.

582 Martinez-Villaluenga, C., Peñas, E., Ciska, E., Piskula, M. K., Kozłowska, H., Vidal-
583 Valverde, C., & Frias, J. (2010). Time dependence of bioactive compounds and antioxidant
584 capacity during germination of different cultivars of broccoli and radish seeds. Food
585 Chemistry, 120, 710-716.

586 Melo, E. A., Maciel, M. I. S., Lima, V. L. A. G., & Santana, A. P. M. (2009). Capacidade
587 antioxidante de hortaliças submetidas a tratamento térmico. Nutrire: Revista da Sociedade
588 Brasileira de Alimentação e Nutrição, 34(1), 85-96.

589 Melo, E. A., Maciel, M. I. S., Lima, V. L. A. G., Leal, F. L. L., Caetano, A. C. S., &
590 Nascimento, R. J. (2006).. Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas.
591 Revista Ciências e Tecnologia de Alimentos, 26(3), 639-644.

592 Moreira, C. F. F., Lopes, M. L. M., & Valente-Mesquita, V. L. (2012). Impacto da estocagem
593 sobre atividade antioxidante e teor de ácido ascórbico em sucos e refrescos de tangerina.
594 Revista de Nutrição, 25(6), 743-752.

595 Murador, D. C., Mercadante, A. Z., & Rosso, V. V. D. (2016). Cooking techniques improve
596 the levels of bioactive compounds and antioxidant activity in kale and red cabbage. Food
597 Chemistry, 196(1), 1101-1107.

598 Naguib, A. E. M. M., El-Baz, F. K., Salama, Z. A., Hanaa, H. A. E. B., Ali, H. F., & Gaafar,
599 A. A. (2012). Enhancement of phenolics, flavonoids and glucosinolates of Broccoli (*Brassica*
600 *oleracea*, var. *Italica*) as antioxidants in response to organic and bio-organic fertilizers.
601 Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences, 11, 135–142.

602 Neugart, S., Fiol, M., Schreiner, M., Rohn, S., Zrenner, R., Kroh, L. W., Krumbein, A.
603 (2013). Low and moderate photosynthetically active radiation affects the flavonol glycosides
604 and hydroxycinnamic acid derivatives in kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*) dependent on
605 two low temperatures. Plant Physiology and Biochemistry, 72, 161-168.

606 Null, G., & Feldman, M. (2011). The health-boosting properties of Super Foods. Townsend
607 Letter, 62-67.

608 Oliveira, S. M., Ramos, I. N., Brandão, T. R. S., & Silva, C. L. M. (2015). Effect of air-drying
609 temperature on the quality and bioactive characteristics of dried Galega kale (*Brassica*
610 *oleracea* L. var. *acephala*). Journal of Food Processing and Preservation, 39, 2485–2496.

611 Park, S., Arasub, M. V., Jiangc, N., Choic, S.-H., Limd, Y. P., Parkc, J. -T., ... Kime, S.-J.
612 (2014). Metabolite profiling of phenolics, anthocyanins and flavonols in cabbage (*Brassica*
613 *oleracea* var. *capitata*). Industrial Crops and Products, 60, 8–14.

614 Ribeiro, O. A. S., Boari, C. A., Fonseca, C. M., Figueiredo, S. P., Neumann, D., & Abreu, L.
615 R. (2014). Bebida láctea fermentada formulada com *Camellia sinensis*. Boletim CEPPA,
616 32(2), 289-304.

617 Rigueira, G. D. J., Bandeira, A. V. M., Chagas, C. G. O., & Milagres, R. C. R. M. (2016).
618 Atividade antioxidante e teor de fenólicos em couve-manteiga (*Brassica oleracea l. var.*
619 *acephala*) submetida a diferentes sistemas de cultivo e métodos de preparo. Semina: Ciências
620 Biológicas e da Saúde, 37(2), 3-12.

621 Santos, M. H. D., Batista, B. L., Duarte, S. M. S., Abreu, C. M. P., Gouvêa, C. M. C. P.
622 (2007). Influência do processamento e da torrefação sobre a atividade antioxidante do café
623 (*Coffea arabica*). *Química Nova*, 30(3), 604-610.

624 Sgarbieri, V. C. (2004). Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite.
625 *Revista de Nutrição*, 17(4), 397-409.

626 Sikora, E., Cieślik, E., Leszczyńska, T., Filipiak-Florkiewicz A., Pisulewski, P. M. (2008).
627 The antioxidant activity of selected cruciferous vegetables subjected to aquathermal
628 processing. *Food Chemistry*, 107, 55-59.

629 Simões, A. N., Moreira, S. I., Mosquim, P. R., Soares, N. F. F., & Puschmann, R. (2015). The
630 effects of storage temperature on the quality and phenolic metabolism of whole and
631 minimally processed kale leaves. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 37(1), 101-107.

632 Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols
633 and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods*
634 *In Enzymology*, 299(1), 152-178.

635 Skrede, G., Larsen, V. B., Aaby, K., Jørgensen, A. S., & Birkeland, S.-E. (2004).
636 Antioxidative properties of commercial fruit preparations and stability of bilberry and black
637 currant extracts in milk products. *Journal of Food Science*, 69(9), 351-356.

638 Soengas, P., Cartea, M. E., Francisco, M., Sotelo, T., & Velasco, P. (2012). New insights into
639 antioxidant activity of Brassica crops. *Food Chemistry*, 134, 725-733.

640 Sousa, C., Taveira, M., Valentão, P., Fernandes, F., Pereira, J. A., Estevinho, L., ... Andrade,
641 P. B. (2008). Inflorescences of Brassicacea species as source of bioactive compounds: A
642 comparative study. *Food Chemistry*, 110, 953-961.

643 Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Serrano, C., Matos, O., Neng, N. R., ... Nunes, M. L.
644 (2013). Chemical composition and bioactivity of different oregano (*Origanum vulgare*)
645 extracts and essential oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 2707-2714.

646 Thamer, K. G., & Penna, A. L. B. (2006). Caracterização de bebidas lácteas funcionais
647 fermentadas por probióticos e acrescidas de prebióticos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*,
648 26(3), 589-595.

- 649 Vale, A. P., Santos, J., Melia, N., Peixoto, V., Brito, N. V., & Oliveira, M. B. P. P. (2015).
650 Phytochemical composition and antimicrobial properties of four varieties of *Brassica*
651 *oleracea* sprouts. *Food control*, 55, 248-256.
- 652 Wachtel-Galor, S., Wong, K. W., Benzie, I. F. F. (2008). The effect of cooking on *Brassica*
653 vegetables. *Food Chemistry*, 110, 706–710.