

Aditivos Naturais: Potencial conservante na indústria alimentar

Beatriz Cavalcante Santos

Dissertação apresentada à
Escola Superior de Tecnologia e Gestão - Instituto Politécnico de Bragança
para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Química

Orientadores:
Eliana Pereira
Joana S. Amaral
Rafael Defendi

Julho 2026

Agradecimentos

Dedico esta tese a todos que me acompanharam nesse processo de ir em busca dos meus sonhos e me permitiram não só sonhar como tornar tudo isso realidade. Sem vocês tudo que aconteceu até este momento não teria sido possível.

Agradeço ao meu pai, Jesus, que sempre me ensinou que o conhecimento é a única riqueza nessa vida que ninguém pode nos roubar. À minha mãe, Conceição, que sempre fez questão de me lembrar que desistir nunca é uma opção. Muito obrigada por toda a fé, amor e carinho que vocês me dedicaram durante todos esses anos. Eu sou muito grata por tudo que vocês fizeram por mim.

Agradeço ao meu namorado, Marcio, por todo o suporte, amor, carinho e paciência durante esse período da minha vida. Você me auxiliou a compreender como a resiliência e paciência são importantes para conseguir chegar alcançar o que tanto almejo. Sou muito grata por tudo e todo o tempo que passamos juntos durante esse processo e pela sua companhia.

Agradeço a minha família do Piauí e de Joinville - em especial aos meus tios, Andréa e Luiz - por todo apoio, amor, suporte e carinho que vocês me deram nessa jornada. Todos os ensinamentos de vocês durante todos esses anos foram importantes para que isso pudesse acontecer e devo muito do que conquistei até aqui a vocês, durante todos esses anos. Parafraseando uma frase de alguém que amo muito: está com medo, vai com medo mesmo.

Agradeço aos meus amigos, aqueles de longa data e aos que fiz durante esse período da minha vida por ter tido a oportunidade de conhecer vocês. Vocês tornaram essa jornada muito mais especial e rica, não só em experiências como também pelo suporte.

Agradeço aos meus orientadores, professora Eliana Pereira, por me orientar e pela disposição em me ensinar. À professora Joana Amaral, pelo tempo investido em me auxiliar no direcionamento da tese e ao professor Rafael Defendi, pela suporte, preocupação e cuidado em me auxiliar nesse processo em busca da defesa da tese. Vocês três foram essenciais para que esta tese se tornasse o que é agora.

Sou grata por tudo que este ano desenvolvendo a tese me proporcionou, porque foram todas as variáveis envolvidas nesse processo que se equalizaram nas variáveis respostas que tenho hoje na minha vida. Elas não são como a atividade antioxidante porque nem tudo que aconteceu na minha vida pode ser impedido ou retardado por alguma substância!

Índice geral

Índice de equações	i
Índice de figuras	ii
Índice de tabelas	iii
Lista de abreviações	iv
Resumo	vii
Abstract	ix
1. Introdução	1
2. Estado da arte	3
2.1. Evolução histórica das práticas de conservação alimentar	3
2.2. Benefícios da conservação de alimentos	3
2.3. Mecanismos de conservação de alimentos	4
2.4. Conservantes naturais: propriedades e mecanismos de ação	7
2.5. Métodos analíticos para avaliação da atividade antioxidante	9
2.6. Eficácia e aplicação dos conservantes naturais na indústria alimentar	10
2.7. Desafios e estratégias futuras	13
3. Objetivos	16
4. Metodologia	17
4.1. Padrões e reagentes	17
4.2. Aquisição e preparação das matrizes vegetais	17
4.3. Procedimento de extração convencional utilizado para obtenção dos extratos	18
4.4. Caracterização bioativa dos extratos	19
4.4.1. Atividade Antioxidante	19
4.4.2. Ação antimicrobiana	22
4.4.3. Atividade antibacteriana	22
4.4.4. Atividade antifúngica	23
4.5. Caracterização do perfil individual de compostos fenólicos	25
4.6. Planeamento experimental e otimização do processo de extração assistida por ultrassons	26
4.7. Validação experimental do ponto ótimo	28

4.8.	Comparação entre o extrato otimizado e um extrato comercial	28
5.	Resultados e discussão	30
5.1.	Caracterização bioativa das diferentes matrizes vegetais	30
5.1.1.	<i>Atividade antioxidante</i>	30
5.2.	Atividade antimicrobiana	32
5.3.	Atividade antifúngica	36
5.4.	Citotoxicidade e atividade anti-inflamatória	38
5.5.	Otimização da extração dos compostos antioxidantes da urtiga	41
5.5.1.	<i>Resposta do planejamento experimental e resposta do DCC</i>	41
5.5.2.	<i>Ajuste dos modelos matemáticos e análise estatística</i>	43
5.5.3.	<i>Superfícies de resposta e determinação do ponto ótimo</i>	50
5.5.4.	<i>Extrato de urtiga obtido no ponto ótimo</i>	54
6.	Conclusão	65
	Referências	67

Índice de equações

Equação 1. Reação do radical ião férrico	10
Equação 2. Equação da determinação da taxa de inibição em ensaio TBARS.	20
Equação 3. Equação polinomial de segunda ordem para as respostas.	44

Índice de figuras

Figura 1. Fluxograma de mecanismos de conservação de alimentos adaptado de Amit et al. (2017).....	5
Figura 2. Reação de cromogenação do TBA com MDA.....	9
Figura 3. Reação de radical DPPH com um antioxidante	10
Figura 4. Representação esquemática dos objetivos do estudo.....	16
Figura 5. Amostragem utilizada no presente estudo: (A) Urtiga., (B) Bio resíduos de romã e (C) bio resíduos de brócolo.	18
Figura 6. Algumas das etapas do procedimento de extração. Filtração (A), evaporação (B) e extrato (C).....	19
Figura 7. Ensaio avaliativo da inibição da peroxidação lipídica pelo método TBARS.	20
Figura 8. Determinação do Poder Redutor.	21
Figura 9. Determinação da atividade antioxidante dos extratos hidroetanólicos pelo método DPPH.	22
Figura 10. Sistema cromatográfico HPLC-DAD-ESI/MS utilizado na caracterização do perfil individual de compostos fenólicos.	26
Figura 11. Resultados obtidos para a linha celular AML 12.....	38
Figura 12. Resultados obtidos para a linha celular Caco-2	39
Figura 13. Resultados obtidos para a linha celular RAW 264.7	39
Figura 14. Gráfico de superfície de resposta tridimensional dos compostos fenólicos.....	51
Figura 15. Gráfico de superfície de resposta tridimensional da atividade antioxidante (DPPH).	52
Figura 16. Gráfico de superfície de resposta tridimensional do rendimento de extração.	52

Índice de tabelas

Tabela 1. Classificação dos aditivos segundo o código E adaptada de L. Wu et al. (2022).....	7
Tabela 2. Exemplos de conservantes naturais de acordo com suas potenciais aplicações na indústria alimentar.	11
Tabela 3. Exemplos notáveis de conservantes naturais.	12
Tabela 4. Avaliação da atividade antioxidante dos extratos hidroetanólicos através de diferentes métodos.	30
Tabela 5. Atividade antibacteriana (CMI e CMB mg/mL) dos extratos.	34
Tabela 6. Atividade antifúngica dos extratos.	36
Tabela 7. Planejamento de delineamento composto central (DCC) contendo as variáveis independentes avaliadas e os resultados de rendimento e FT dos extratos.	43
Tabela 8. Modelo matemático completo.	45
Tabela 9. Tabela ANOVA para os compostos fenólicos.....	47
Tabela 10. Tabela ANOVA para o DPPH.	48
Tabela 11. Tabela ANOVA para a massa seca.....	48
Tabela 12. modelo matemático ajustado.	49
Tabela 13. Ponto ótimo da otimização do extrato de urtiga.	53
Tabela 14. Avaliação da atividade antioxidante do ponto ótimo do extrato de urtiga	55
Tabela 15. Compostos fenólicos identificados no extrato de urtiga obtido por EAU nas condições ótimas. Resultados expressos em mg/g (média $\pm$ desvio padrão).	59
Tabela 16. Atividade antimicrobiana do extrato de urtiga frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas avaliadas por CMI e CMB.	61
Tabela 17. Avaliação da atividade antifúngica do extrato de urtiga (<i>Urtica</i> sp.) por CMI e CFM contra <i>Aspergillus brasiliensis</i> e <i>Aspergillus fumigatus</i>	63

Lista de abreviações

AML	Linhagem de hepatócitos murinos Alpha Mouse Liver 12
ANOVA	Análise de variância
ABTS	2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
CAA	Atividade antioxidante celular
Caco-2	Células de carcinoma de cólon humano
CFM	Concentração fungicida mínima
CMB	Concentração mínima bactericida
CMI	Concentração mínima inibitória
COX-2	Ciclooxigenase-2
CXCL8	Interleucina-8
DCCR	Delineamento composto central rotacional
DCF	Diclorofluoresceína fluorescente
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazilo
EAM	Extração assistida por micro-ondas
EC ₅₀	Concentração de extrato correspondente a 50% da atividade antioxidante
EFSA	European Food Safety Authority
EO	Essential Oil
ES	Extração Soxhlet
FDA	Food and Drug Administration
FSMA	Food Safety Modernization Act
FT	Fenólicos totais
GAE	Equivalentes de ácido gálico
GRAS	Generally Recognized as Safe
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HPLC-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de díodos
HPLC-MS	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas
IC ₅₀	Concentração inibitória 50%
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
INT	Cloreto de <i>p</i> -iodonitrotetrazólio
LPS	Lipopolissacarídeo

[M-H] ⁻	Ião pseudomolecular
m/z	Razão massa/carga
MA	Malter agar
MATLAB	Software para simulação e análise de dados
MDA	Malondialdeído
MDA-TBA	Complexo cromogénico
MS ² , MS ⁿ	Espectrometria de massas em tandem
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
ns	Não significativo
ODS	Objetivos de Desenvolvimento Sustentável
ORAC	<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i>
p/v	Massa/volume
PDA	Ágar batata dextrose
pH	Potencial hidrogeniônico
ppm	Partes por milhão
PR	Poder redutor
R ²	Coeficiente de determinação
R ² adj	Coeficiente de determinação ajustado
RAW 264.7	Macrófagos murinos induzidos por vírus da leucemia murina de Abelson
rpm	Rotações por minuto
RSM	Metodologia de superfície de resposta
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Inibição da peroxidação lipídica na presença de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloracético
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TPC	Conteúdo fenólico total
T _r	Tempo de retenção
TSB	Caldo de soja trípico
UAE	Extração Assistida por ultrassom
UE	União Europeia

UFC	Unidade formadoras de colónias
UHPLC	Cromatografia líquida de ultra-alta eficiência
USDA	United States Departament of Agriculture
UV-Vis	Radiação ultravioleta visível
v/v	Volume/volume
λ_{max}	Comprimento de onda de absorção máxima

Resumo

A crescente procura por alimentos mais saudáveis, sustentáveis e com rótulos mais transparentes tem impulsionado a investigação de alternativas naturais aos conservantes sintéticos utilizados pela indústria alimentar. Paralelamente, a valorização de subprodutos agroindustriais tem emergido como uma estratégia promissora para a redução do desperdício alimentar e promoção da economia circular. Neste contexto, diferentes matrizes vegetais constituem fontes relevantes de compostos bioativos com potencial aplicação como conservantes naturais.

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver e caracterizar um extrato natural rico em compostos bioativos com potencial aplicação como conservante alimentar, recorrendo à valorização de diferentes matrizes vegetais, nomeadamente urtiga (*Urtica dioica*), bioresíduos de romã e brócolos. Inicialmente, foram avaliadas as atividades antioxidante e antimicrobiana, bem como a toxicidade dos extratos, de forma a selecionar a matriz com maior potencial bioativo e segurança de utilização. A urtiga foi selecionada para estudos posteriores, tendo o seu processo de extração sido otimizado através da metodologia de superfície de resposta, considerando como variáveis de resposta a atividade antioxidante, o teor de massa seca e o perfil individual de compostos fenólicos.

Posteriormente, o processo de extração foi otimizado através da metodologia de superfície de resposta, utilizando a extração assistida por ultrassom e considerando como variáveis independentes a potência do ultrassom, o tempo de extração e a proporção etanol/água. A otimização teve como objetivo maximizar a atividade antioxidante, o teor de massa seca e a recuperação de compostos fenólicos. As condições ótimas determinadas pelos modelos matemáticos foram posteriormente validadas experimentalmente.

O extrato otimizado foi caracterizado por HPLC-DAD-ESI/MS, permitindo a identificação de sete compostos fenólicos, correspondentes a quatro ácidos fenólicos e três flavonoides, com um teor total de 19,8 mg/g de extrato seco. Os flavonoides constituíram a classe predominante (11,6 mg/g), destacando-se a quercetina-3-O-rutinosídeo (rutina) como composto maioritário, seguida da quercetina-3-O-glicosídeo. Entre os ácidos fenólicos identificados destacaram-se os ácidos cafeoilquínicos e o ácido dicafeoilmálico. Estes compostos estão associados a reconhecidas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, reforçando o potencial bioativo do extrato obtido.

A validação experimental das condições ótimas confirmou a adequação do processo de extração desenvolvido, sendo posteriormente realizada uma comparação com um extrato comercial de urtiga. Os resultados obtidos demonstram o potencial da urtiga como fonte de

compostos fenólicos de interesse para a indústria alimentar, evidenciando a viabilidade da utilização de extratos naturais como alternativa sustentável aos conservantes sintéticos e contribuindo para o desenvolvimento de ingredientes alinhados com o conceito de *clean label*.

Palavras-chave: compostos fenólicos; conservantes naturais; extração assistida por ultrassom; otimização; urtiga

Abstract

The growing demand for healthier, more sustainable foods with more transparent labeling has driven research into natural alternatives to the synthetic preservatives used by the food industry. At the same time, the valorization of agro-industrial byproducts has emerged as a promising strategy for reducing food waste and promoting the circular economy. In this context, various plant matrices constitute significant sources of bioactive compounds with potential application as natural preservatives.

The objective of this study was to develop and characterize a natural extract rich in bioactive compounds with potential application as a food preservative, utilizing different plant matrices, namely stinging nettle (*Urtica dioica*), pomegranate biowaste, and broccoli. Initially, the antioxidant and antimicrobial activities, as well as the toxicity of the extracts, were evaluated to select the matrix with the greatest bioactive potential and safety of use. Stinging nettle was selected for further studies, and its extraction process was optimized using response surface methodology, with antioxidant activity, dry matter content, and the individual profile of phenolic compounds considered as response variables.

Subsequently, the extraction process was optimized using response surface methodology, employing ultrasound-assisted extraction and considering ultrasound power, extraction time, and the ethanol/water ratio as independent variables. The optimization aimed to maximize antioxidant activity, dry matter content, and the recovery of phenolic compounds. The optimal conditions determined by the mathematical models were subsequently validated experimentally.

The optimized extract was characterized by HPLC-DAD-ESI/MS, allowing the identification of seven phenolic compounds, corresponding to four phenolic acids and three flavonoids, with a total content of 19.8 mg/g of dry extract. Flavonoids constituted the predominant class (11.6 mg/g), with quercetin-3-O-rutinoside (rutin) standing out as the major compound, followed by quercetin-3-O-glycoside. Among the identified phenolic acids, caffeoylquinic acids and dicaffeoylmalic acid stood out. These compounds are associated with recognized antioxidant and anti-inflammatory properties, reinforcing the bioactive potential of the obtained extract.

Experimental validation of the optimal conditions confirmed the suitability of the extraction process developed, and a comparison was subsequently conducted with a commercial nettle extract. The results obtained demonstrate the potential of stinging nettle as a source of phenolic compounds of interest to the food industry, highlighting the feasibility of using natural extracts as a sustainable alternative to synthetic preservatives and contributing to the development of ingredients aligned with the clean label concept.

Keywords: natural preservatives; optimization; phenolic compounds; stinging nettle; ultrasound-assisted extraction

1. Introdução

A preferência do consumidor por hábitos alimentares mais saudáveis é uma tendência crescente e multifacetada, impulsionada por diversos fatores sociais, económicos e culturais, nomeadamente o aumento da incidência de doenças crónicas, a influência da consciência ambiental na escolha por alimentos mais naturais e menos processados, entre outros (Plaza et al., 2008).

Desta forma, os consumidores cada vez mais evitam alimentos com aditivos artificiais e excesso de açúcar e lípidos, o que leva a indústria alimentar a reinventar-se através da reformulação de produtos e criação de novas linhas mais saudáveis, que vão de encontro a estas novas tendências de mercado (Chauhan & Rao, 2024).

A incorporação de ingredientes naturais, com funções corante, conservante, aromatizante, e/ou espessante, em produtos alimentares é uma estratégia cada vez mais comum no setor industrial (Wu et al., 2022a). Adicionalmente, é também crescente o número de alimentos contendo ingredientes funcionais disponibilizados pela indústria. Além das vantagens para a saúde, os ingredientes naturais também atendem a preocupações ambientais e éticas (de Carvalho et al., 2023). A produção desses ingredientes, muitas vezes, envolve menor impacto ecológico e pode ser feita a partir de fontes renováveis, o que contribui para práticas mais sustentáveis e para a valorização da biodiversidade, especialmente em países com uma flora vasta e diversificada. Não obstante, o uso de aditivos naturais favorece a transparência nos rótulos, alinhando-se ao conceito de *clean label*, cada vez mais valorizado (Nieto et al., 2023).

Há uma vasta gama de exemplos na literatura que descreve a aplicação de diferentes ingredientes naturais aplicados à indústria alimentar, como óleos essenciais (EO), enzimas e ácidos orgânicos (Teshome et al., 2022). No entanto, embora sejam naturais, é importante salientar que mesmo estes aditivos necessitam de passar por rigorosos processos de regulamentação e aprovação antes de serem utilizados em produtos alimentares comercializados. Este processo visa garantir a segurança do consumidor, comprovar a eficácia tecnológica do aditivo e estabelecer condições de uso adequadas, assegurando o seu uso responsável (Dong et al., 2024).

Paralelamente a esta estratégia de inovação, o setor agroalimentar depara-se também com a preocupação relacionada com o desperdício de alimentos e o acúmulo de resíduos industriais.

Nesse contexto, surge uma alternativa inovadora e sustentável para a valorização de subprodutos agroalimentares: a extração de ingredientes naturais a partir de bioresíduos ou

subprodutos do setor agroalimentar. Esses resíduos, frequentemente descartados, são ricos em compostos bioativos com potencial para atuarem como corantes, antioxidantes, conservantes, espessantes, aromatizantes e/ou emulsificantes naturais (Faustino et al., 2019).

A reintrodução desses subprodutos na cadeia alimentar, para além de promover uma redução de resíduos orgânicos na cadeia produtiva, promove a diminuição do impacto ambiental, a inovação tecnológica e o desenvolvimento económico do setor (Ligarda-Samanez et al., 2025).

Desse modo, o presente trabalho visa desenvolver um extrato natural rico em compostos com propriedades conservantes a partir do estudo de vários subprodutos seleccionados, com foco na incorporação num produto alimentar.

2. Estado da arte

2.1. Evolução histórica das práticas de conservação alimentar

No decurso da história, a formação de sociedades esteve ligada à caça e à agricultura (Wu et al., 2022). A alimentação ancestral era adaptada às condições climáticas, aos recursos disponíveis, aos métodos de caça e às técnicas de preservação utilizadas (Knorr & Augustin, 2023).

No Egito Antigo, a crença na vida após a morte incluía a conservação de alimentos através de métodos como a secagem com sal e a utilização de sal, resina e bandagens, de forma a permitir o seu consumo no além (Halawa, 2023; Taylor, 2010). Na Idade Média, o acesso aos alimentos refletia o estatuto social, sendo comuns métodos como salga, defumação e a aplicação de álcool para prolongar o tempo de conservação dos alimentos (Williams, 2015; Woolgar et al., 2006).

No século XVII, Nicolas Appert, apresentou técnicas de esterilização e armazenamento que marcaram o início da conservação moderna dos alimentos (Varzakas & Tzia, 2015). Posteriormente, no século XIX, o desenvolvimento da microbiologia permitiu compreender a relação entre microrganismos e deterioração alimentar, impulsionando o desenvolvimento de novos métodos de conservação (Science Museum, 2019).

Este período foi igualmente marcado pelo início da síntese de aditivos químicos. William Henry Perkins, foi responsável pela descoberta do primeiro corante sintético, representando um marco importante para a indústria química e alimentar (Sun & Wang, 2017). Pouco depois, surgiram compostos como a sacarina, cuja utilização foi posteriormente restringida em alguns países devido a potenciais riscos para a saúde humana. Além da sacarina, outro aditivo amplamente utilizado é o glutamato de sódio, responsável por intensificar o sabor umami dos alimentos (Ault, 2004; Guillem-Llobat, 2011).

2.2. Benefícios da conservação de alimentos

A conservação de alimentos apresenta diversas vantagens práticas para além do simples prolongamento do prazo de validade. Uma das principais vantagens consiste em garantir a segurança alimentar, permitindo a disponibilização de uma maior variedade de alimentos ao longo do ano. Além disso, alguns métodos de conservação contribuem para a preservação de nutrientes, mantendo o valor nutricional original dos alimentos. Outros benefícios incluem vantagens económicas e ambientais, uma vez que, a conservação de

alimentos contribui para a redução do desperdício alimentar e das perdas económicas associadas. Consequentemente, verifica-se também uma diminuição dos impactos ambientais negativos relacionados com a produção, transporte e eliminação de alimentos. Ao reduzir o desperdício e a necessidade de produção e transporte excessivo, também se contribui para a diminuição da pegada de carbono e para a promoção da sustentabilidade ambiental (Food Industry Capacity & Skill Initiative, 2024).

A segurança alimentar baseia-se na garantia do acesso físico, social e económico a alimentos seguros e nutricionalmente adequados, capazes de satisfazer as necessidades nutricionais diárias da população, respeitando simultaneamente hábitos alimentares saudáveis e preferências culturais (Mbow et al., 2022). Neste contexto, a segurança alimentar e a cultura apresentam uma relação intrínseca, dado que os hábitos alimentares de uma população influenciam a formulação de dietas que integrem diferentes grupos nutricionais (Briones Alonso et al., 2018).

Segundo a OMS (2024), uma alimentação saudável depende de vários fatores, como a disponibilidade de alimentos na região, hábitos alimentares individuais e as tradições culturais. A disponibilidade alimentar influencia igualmente aspetos económicos e ambientais associados à sustentabilidade da cadeia alimentar. Esta cadeia inicia-se na produção agrícola e termina no consumidor final, o qual é frequentemente desempenha um papel importante na definição das tendências de consumo alimentar. No entanto, o aumento da disponibilidade de alimentos está também associado ao crescimento do desperdício alimentar (Martindale & Schiebel, 2017). Este último encontra-se relacionado com diversas tendências atuais, incluindo a urbanização, crescimento das megacidades, as alterações demográficas e as mudanças nos hábitos de consumo da população (Cole et al., 2018). Deste modo, os mecanismos de conservação alimentar assumem um papel fundamental na extensão do prazo de validade dos alimentos, contribuindo simultaneamente para a segurança alimentar e para a redução do desperdício alimentar (Lisboa et al., 2024).

2.3. Mecanismos de conservação de alimentos

Considerando que os alimentos ou produtos alimentares apresentam uma elevada suscetibilidade à deterioração devido à ação dos microrganismos, nomeadamente bactérias e fungos, de enzimas naturais e reações químicas, a sua conservação constitui uma necessidade sanitária, económica e social (Singh & Desrosier, 2025). A conservação alimentar engloba métodos e técnicas destinados a prolongar a vida útil dos alimentos, através da inibição do

crescimento microbiano, do retardamento de reações químicas e da prevenção de alterações físicas responsáveis pela deterioração (Dwivedi et al., 2017). Este princípio é sustentado por normas internacionais, como o Regulamento (CE) n.º 178/2002 da União Europeia, que estabelece requisitos gerais de segurança alimentar, e pela *Food Safety Modernization Act (FSMA)* da *Food and Drug Administration (FDA)*, nos Estados Unidos, que define medidas preventivas de segurança alimentar.

De acordo com Amit et al. (2017), os métodos de conservação alimentar podem ser classificados em diferentes categorias, como apresentado no fluxograma da **Figura 1**.

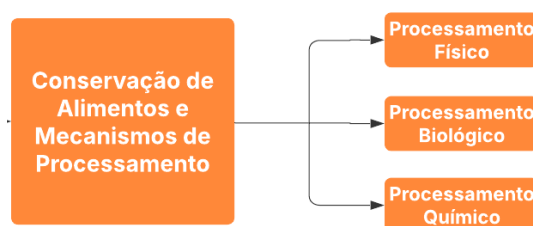


Figura 1. Fluxograma de mecanismos de conservação de alimentos adaptado de Amit et al. (2017).

Esses métodos incluem técnicas destinadas a retardar a degradação dos alimentos, aumentando a sua durabilidade e garantindo a sua segurança e qualidade. Alguns alimentos, como frutas, vegetais, carnes e peixes, apresentam elevado teor de água (geralmente entre 80% a 90%), sendo altamente suscetíveis à degradação, sobretudo por ação microbiológica. Nesse contexto, o processamento físico desempenha um papel fundamental na conservação dos componentes dos produtos alimentares (Fathi et al., 2022).

Entre os principais métodos físicos de conservação destaca-se a desidratação, processo no qual ocorre a redução do teor de água e, consequentemente, do volume dos alimentos. Embora seja uma técnica eficaz na preservação alimentar, pode provocar alterações estruturais, incluindo encolhimento, diminuição da capacidade de reidratação e modificações na superfície do produto (Mahiuddin et al., 2018).

Outro método amplamente utilizado é a esterilização, que consiste num processo térmico rigorosamente controlado com o objetivo de inativar microrganismos, incluindo bactérias, fungos, vírus e esporos. Contudo, esta técnica apresenta limitações relativamente à inativação de príões (estruturas proteicas infecciosas que demonstram elevada resistência aos procedimentos convencionais de esterilização) e pode causar a perda de micronutrientes em alguns alimentos (Soni et al., 2020).

A pasteurização, especialmente aplicada em produtos lácteos, é igualmente um processo físico de conservação que permite aumentar o tempo de vida útil dos alimentos, através da eliminação de microrganismos patogénicos. Esta técnica envolve a aplicação de temperaturas controladas durante um período experimentalmente definido, permitindo reduzir a carga microbiana sem comprometer significativamente as características nutricionais e sensoriais do alimento (Rabbani et al., 2025).

A utilização de baixas temperaturas constitui outra técnica amplamente empregue na conservação alimentar, sendo a sua eficácia diretamente influenciada pelo teor de água presente nos alimentos. Durante o congelamento, a água forma cristais de gelo cujas características (como tamanho, forma e distribuição) influenciam diretamente a qualidade final do produto. Cristais de gelo de grandes dimensões podem provocar ruturas nas membranas celulares, resultando na perda de líquidos intracelulares durante o descongelamento e comprometendo a textura e a integridade estrutural dos alimentos (Sun et al., 2023).

O processamento biológico refere-se, principalmente, aos processos de fermentação, cuja finalidade consiste na utilização de microrganismos e enzimas para conservar de alimentos. Esse método baseia-se na decomposição controlada de compostos orgânicos através da ação microbiana. Os principais agentes envolvidos incluem bactérias, leveduras e fungos filamentosos, aplicados numa ampla variedade de produtos alimentares, como lacticínios, cereais e produtos cárneos (Sivasankar, 2002).

Por sua vez, o processamento químico baseia-se na utilização de aditivos alimentares, substâncias adicionadas aos alimentos com objetivo de conservar, intensificar o sabor, melhorar a aparência ou otimizar propriedades sensoriais e funcionais. Entre os principais grupos de aditivos, destacam-se os emulsificantes, corantes, agentes antimicrobianos, estabilizantes, antioxidantes e conservantes (Wu et al., 2022). Na União Europeia, estes compostos são regulados pelo Regulamento (CE) nº 1333/2008 (EU), enquanto nos Estados Unidos são regulados pelo 21 CFR Part 170 (EUA), os quais estabelecem os tipos permitidos, limites de utilização e condições específicas de aplicação (Comissão Europeia, 2008).

Na **Tabela 1** encontram-se representados os diferentes grupos de aditivos alimentares e os respetivos códigos E que os identificam.

Tabela 1. Classificação dos aditivos segundo o código E adaptada de L. Wu et al. (2022).

Número E de classificação	Classificação
E100- E199	Coloríficos
E200- E299	Conservantes
E300- E399	Antioxidantes
E500- E599	Agente anti bolor
E900- E999	Emulsificantes / estabilizantes

Na União Europeia, os aditivos alimentares autorizados são classificados através de um **código E**, indicando que foram submetidos a avaliações científicas de sua segurança realizadas pela Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA). Esta classificação permite harmonizar a utilização de aditivos entre os Estados-Membros e assegurar o cumprimento de critérios toxicológicos, tecnológicos e de pureza (European Food Safety Authority, 2025) .

No entanto, nem todos os grupos de aditivos recebem autorização para utilização na indústria alimentar. Um exemplo corresponde ao grupo E700–E799, historicamente associado a antibióticos, cuja utilização em alimentos destinados ao consumo humano não é autorizada devido ao potencial toxicológico e alergénico, bem como ao risco de contaminação cruzada durante os processos de produção. Por esse motivo, estes compostos encontram-se excluídos das listas de substâncias autorizadas na União Europeia, conforme estabelecido pelo Regulamento (CE) n.º 1333/2008 (Pandit et al., 2020; Comissão Europeia, 2008b).

Apesar da ampla utilização de aditivos sintéticos na indústria alimentar, a crescente preocupação dos consumidores relativamente aos potenciais efeitos adversos associados ao seu consumo tem impulsionado a procura por alternativas naturais. Neste contexto, os extratos vegetais ricos em compostos bioativos têm despertado interesse devido às suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas, apresentando elevado potencial para aplicação como conservantes naturais em alimentos.

2.4. Conservantes naturais: propriedades e mecanismos de ação

Os conservantes naturais, também denominados de compostos antimicrobianos e antioxidantes, têm vindo a destacar-se como alternativas promissoras aos aditivos químicos sintéticos, devido à sua capacidade de inibir o crescimento de microrganismos patogénicos e deteriorantes, prolongando a vida útil dos alimentos sem recorrer a compostos sintéticos, frequentemente associados a potenciais riscos para a saúde humana (Pisoschi et al., 2018). Ácidos fenólicos, flavonoides, terpenos e taninos presentes em frutas, vegetais, grãos, ervas e especiarias constituem algumas das principais classes bioativas responsáveis por essas propriedades (Zhang et al., 2010).

Entre as propriedades mais relevantes desses compostos destaca-se a atividade antioxidante, responsável por retardar a oxidação de lipídios e outras moléculas, através da neutralização de radicais livres, contribuindo para a preservação da qualidade e estabilidade dos alimentos (Zheng; Wang, 2001). Além disso, estudos recentes demonstram que compostos fenólicos e outros metabólitos secundários podem apresentar propriedades antimicrobianas, antivirais, anti-inflamatórias, anticarcinogênicas, antidiabéticas, anti-hipertensivas e moduladoras da microbiota intestinal, reforçando seu potencial enquanto conservantes funcionais e promotores de saúde (Yarmolinsky et al., 2024)

O efeito desses compostos na saúde do consumidor encontra-se associado, entre outros fatores, à redução do risco de doenças crônicas, incluindo doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2 e neurodegenerativas, devido às suas atividades antioxidantes, anti-inflamatórias e moduladoras do metabolismo celular. Adicionalmente, a interação com a microbiota intestinal pode favorecer a produção de metabólitos benéficos, contribuindo para o reforço da barreira intestinal e da resposta imunológica (Singh & Yadav, 2022).

Os mecanismos de ação associados aos antimicrobianos são diversos e complementares, demonstrando que estes compostos não atuam apenas por inibição direta de microrganismos. Entre os principais mecanismos identificados na literatura, destacam-se:

- Modulação da membrana celular, através da interação de compostos bioativos com a membrana microbiana, alterando sua permeabilidade e comprometendo funções celulares essenciais (Gavahian et al., 2020).
- Inibição da replicação de DNA/RNA e do metabolismo microbiano, dificultando a multiplicação e sobrevivência dos microrganismos (Dong et al., 2024).
- Inibição da formação de biofilmes, aumentando a suscetibilidade microbiana e facilitando a eliminação de microrganismos resistentes (Lee & Paik, 2016).
- Atividade de peptídeos antimicrobianos de origem vegetal (pAMPs), capazes de alterar a integridade da membrana e modular respostas imunológicas (Karnwal & Malik, 2024).
- Proteção do DNA celular, através da atividade antigenotóxica de determinados compostos fenólicos, reduzindo danos oxidativos e contribuindo para a segurança alimentar (Diogo Gonçalves et al., 2025).

Neste contexto, os extratos vegetais ricos em compostos bioativos têm despertado um interesse crescente na indústria alimentar, devido ao seu potencial para aplicação como

conservantes naturais multifuncionais, capazes de combinar propriedades antioxidantes e antimicrobianas com benefícios adicionais para a saúde do consumidor.

2.5. Métodos analíticos para avaliação da atividade antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante pode ser realizada através de diferentes métodos analíticos, entre os quais se destacam os ensaios de TBARS, DPPH e PR (poder redutor).

O ensaio TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances) baseia-se na quantificação de produtos resultantes da oxidação lipídica, em particular o malondialdeído (MDA). Este composto reage com duas moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA), na presença de iões H^+ e sob aquecimento, originando um complexo cromogénico (MDA-TBA) de coloração rosa (**Figura 2**), cuja absorvância é medida entre 532–535 nm.

A oxidação é, normalmente, promovida numa matriz rica em lípidos, como o homogenato de cérebro de porco, sendo induzida pela adição de iões metálicos, nomeadamente ferro ou cobre, que catalisam a formação de espécies reativas.

A inibição do processo oxidativo depende da presença de compostos antioxidantes na amostra, capazes de interromper as reações em cadeia da peroxidação lipídica. Assim, quanto maior a capacidade antioxidante da amostra, menor será a formação do complexo cromogénico, refletindo-se numa menor intensidade da coloração rosa observada (Damodaran et al., 2008).

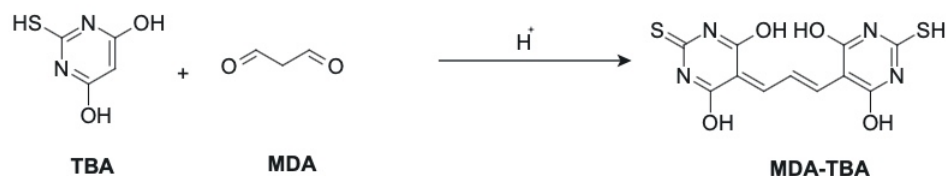


Figura 2. Reação de cromogénico do TBA com MDA.

De outro modo, o ensaio de DPPH consiste na redução do radical estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•) na presença de compostos antioxidante. Esta reação (**Figura 3**) promove a diminuição da coloração violeta característica do radical, resultando numa redução na absorvância, geralmente medida de 515 – 517 nm, conforme descrito por Brand-Williams et al. (1995).

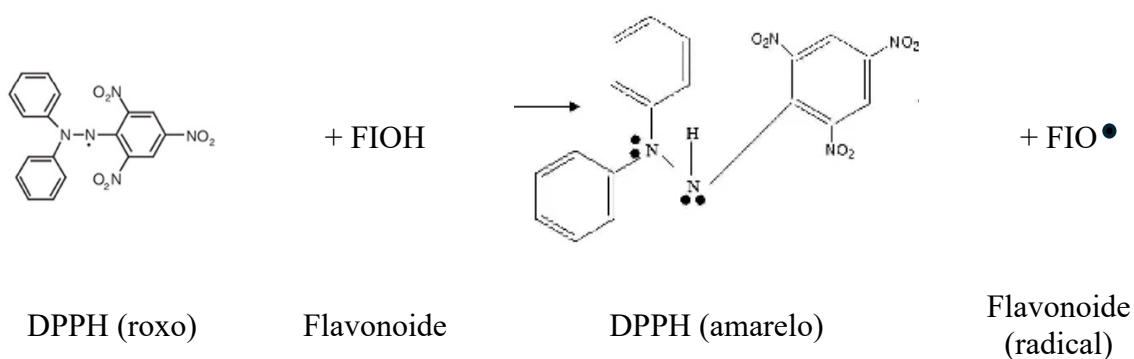
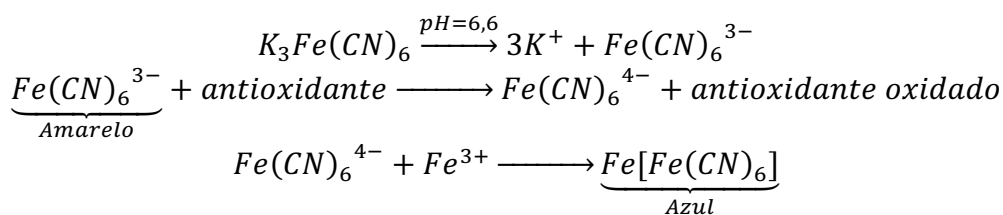


Figura 3. Reação de radical DPPH com um antioxidante

O ensaio PR (**equação 1**) avalia a capacidade redutora de compostos antioxidantes através da conversão do íon férrico (Fe^{3+}) em íon ferroso (Fe^{2+}). Na presença do reagente TPTZ (2,4,6-tripiridil-*s*-triazina), ocorre a formação de um complexo colorido cuja absorbância é normalmente determinada a 593 nm. A tonalidade amarela é alterada para azul ou verde, dependendo do poder redutor dos compostos (Benzie & Strain, 1996).

A química do ensaio é descrita pelas seguintes equações:



Equação 1. Reação do radical íon férrico

2.6. Eficácia e aplicação dos conservantes naturais na indústria alimentar

Considerando as múltiplas propriedades bioativas e os mecanismos complementares discutidos anteriormente, os conservantes naturais demonstram capacidade não apenas para preservar a qualidade estrutural, sensorial e nutricional dos alimentos, mas também para garantir a segurança do alimento e proporcionar potenciais benefícios à saúde do consumidor. Essa combinação de efeitos fundamenta a sua utilização prática em diferentes matrizes alimentares e condições de processamento (Munekata et al., 2023).

Os conservantes naturais promovem maior estabilidade dos alimentos e proteção contra microrganismos patogênicos e deteriorantes, contribuindo para prolongamento da vida útil. Adicionalmente, apresentam potencial aplicação em processos de descontaminação alimentar, e podem constituir alternativas economicamente viáveis, especialmente quando obtidos a partir

de matérias-primas abundantes ou subprodutos agroindustriais. Contudo, a sua eficácia depende de diversos factores, incluindo o tipo de composto bioativo, da concentração utilizada e a natureza da matriz alimentar (Rathee et al., 2023).

A aplicação industrial desses compostos requer igualmente a consideração de diferentes fatores tecnológicos, nomeadamente os métodos de extração utilizados, o controlo de pH e a interação com técnicas físicas de conservação, como refrigeração, embalagem a vácuo, radiação ou tratamento térmico. A combinação adequada dessas estratégias permite otimizar a estabilidade dos compostos ativos, preservar as propriedades sensoriais e nutricionais dos alimentos e potencializar a atividade antimicrobiana e antioxidante. Estudos recentes demonstram que a integração de conservantes naturais com métodos físicos de conservação pode proporcionar soluções mais seguras, sustentáveis e alinhadas com a crescente procura por alimentos minimamente processados e com menor incorporação de aditivos sintéticos (Novais et al., 2022).

Com base nesses princípios, a **Tabela 2** apresenta algumas das aplicações de conservantes naturais na indústria alimentar, ilustrando a incorporação de diferentes compostos bioativos em produtos específicos com o objetivo de prolongar a vida útil, preservar a qualidade sensorial e garantir a segurança alimentar.

Tabela 2. Exemplos de conservantes naturais de acordo com suas potenciais aplicações na indústria alimentar.

Aditivos	Aplicação	Potencial Destino	Referência
OE	Antimicrobiano	Filmes antimicrobianos	(Punia Bangar et al., 2021)
Extrato da casca de coco	Antioxidante	Material de embalagem	(Deshmukh & Gaikwad, 2024)
Peptídeos bioativos de cominho	Antimicrobiana e antioxidante	atividade antifúngica contra <i>Candida albicans</i>	(Mijiti et al., 2025)
Ácido acético	Antimicrobiana e acidificante	Usado em conservas, pickles e queijos para prolongar a vida útil e inibir o crescimento de microrganismos.	(Lucera et al., 2012)

A indústria alimentar tem registado diversos casos de sucesso na substituição de conservantes sintéticos por alternativas naturais com funcionalidades semelhantes. Estas abordagens não apenas respondem à crescente procura por produtos mais saudáveis, como também refletem estratégias de inovação e sustentabilidade industrial. Na **Tabela 3**, estão presentes alguns exemplos de aplicação de conservantes naturais em diferentes matrizes alimentares.

Tabela 3. Exemplos notáveis de conservantes naturais.

Resíduos agroalimentares	Produto	Aplicação	Referência
Flor de castanheiro	Conservante natural desenvolvido a partir da flor da castanheira	Substituição dos sulfitos presente no vinho	(Alaya et al., 2021)
Orégano, tomilho e capim-limão	Óleos essenciais de orégano, tomilho e capim-limão	Em filés de truta	(Torres Neto et al., 2024)
Sálvia e manjerição	Extrato de sálvia e manjerição	Conservante natural em iogurte	(Ueda et al., 2021)
Resíduos de erva mate	Extrato de erva mate	Conservante natural de panqueca	(Menezes et al., 2023)
Resíduos de ananás	Extrato da coroa e casca do abacaxi	Produtos de confeitaria portuguesa	(Moreira et al., 2022)
<i>Aspergillus niger</i> (encontrado em resíduos do trigo)	Ácido cítrico	Conservação de carne de frango	(Osazuwa et al., 2024)

Os exemplos apresentados demonstram que resíduos agroindustriais provenientes de frutas, ervas aromáticas e microrganismos podem ser valorizados como fontes de compostos bioativos com potencial aplicação conservante. Neste contexto, os subprodutos da indústria alimentar assumem elevado valor acrescentado, uma vez que podem ser utilizados como fontes de biomassa para obtenção de compostos antioxidantes e antimicrobianos (Kuo et al., 2024). Na indústria de processamento da laranja, por exemplo, subprodutos como a casca, flores, e gromos têm sido utilizados no desenvolvimento de nano estruturas e na extração de polifenóis com potencial aplicação nas indústrias farmacêutica, alimentar e química (Rosales & Fabi, 2023).

Alaya et al. (2021), desenvolveram um conservante natural a partir de flores do castanheiro (*Castanea sativa* Mill), obtendo extratos com elevada atividade antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória, sem toxicidade relevante, evidenciando potencial aplicação como ingrediente funcional e conservante natural aplicável a diferentes alimentos. Em produtos de origem animal, Torres Neto et al. (2024) investigaram a aplicação de uma nano emulsão estabilizada por ultrassons e incorporada com óleos essenciais de orégano, tomilho e capim-limão em filetes de truta. O estudo avaliou a atividade antimicrobiana frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella Enteritidis*, demonstrando redução significativa da carga microbiana e prolongamento da vida útil do produto, confirmando o potencial da formulação como alternativa aos conservantes sintéticos.

No estudo desenvolvido por Ueda et al. (2021), extratos de sálvia (*Salvia officinalis* L.) e manjerição (*Ocimum basilicum* L.) foram incorporados em iogurte natural, sendo posteriormente avaliados quanto à composição fenólica, atividade antioxidante e atividade

antimicrobiana. Os resultados demonstraram capacidade de inibição de microrganismos deteriorantes e patogénicos, bem como melhoria da estabilidade oxidativa do produto. Apesar dos resultados promissores, os autores salientaram que o estudo foi realizado exclusivamente à escala laboratorial, não tendo sido efetuada extrapolação direta para aplicação industrial.

Outros estudos exploraram igualmente o aproveitamento de subprodutos vegetais como fontes de compostos bioativos. Menezes et al. (2023) investigaram resíduos de erva-mate, obtendo extratos ricos em compostos fenólicos com atividade antioxidante e antimicrobiana significativa, embora limitada a ensaios laboratoriais. De forma semelhante, Moreira et al. (2022) avaliaram subprodutos do ananás, incluindo casca e coroa, identificando compostos fenólicos e flavonoides com potencial conservante para aplicação em produtos de confeitaria portuguesa.

Por outro lado, Osazuwa et al. (2024) demonstraram uma abordagem com maior potencial de aplicação industrial ao produzirem ácido cítrico por fermentação de resíduos de trigo utilizando *Aspergillus niger*. O composto obtido foi aplicado na conservação de carne de frango, tendo sido observada redução da deterioração microbiológica e aumento da vida útil do produto, evidenciando a viabilidade da utilização de subprodutos agroindustriais no desenvolvimento de conservantes naturais aplicáveis à indústria alimentar.

De forma geral, os estudos disponíveis demonstram que os conservantes naturais apresentam elevado potencial para aplicação na indústria alimentar, particularmente devido às suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas. Contudo, continuam a existir desafios relacionados com a estabilidade dos compostos bioativos, padronização dos processos de extração, variabilidade das matrizes vegetais e extrapolação dos resultados laboratoriais para escala industrial. Neste contexto, torna-se fundamental desenvolver métodos de extração otimizados e avaliar detalhadamente a composição bioativa e a eficácia funcional dos extratos vegetais, de modo a potenciar a sua aplicação como alternativas sustentáveis aos conservantes sintéticos.

2.7. Desafios e estratégias futuras

Os conservantes naturais representam uma alternativa promissora aos conservantes sintéticos tradicionalmente utilizados na indústria alimentar. No entanto, a sua aplicação continua a exigir estudos aprofundados e validação relativamente ao potencial de utilização em contexto industrial (Kourkoutas & Proestos, 2020). Apesar de diversos estudos identificarem os conservantes naturais como opções mais seguras e sustentáveis, permanece necessária a investigação do impacto destes compostos na formulação e desenvolvimento dos alimentos,

bem como das suas interações com as propriedades físico-químicas das matrizes alimentares e os efeitos associados ao armazenamento (El-Saber Batiha et al., 2021).

Nesse contexto, a interação entre os compostos bioativos presentes em ingredientes naturais com potencial conservante requer uma avaliação detalhada relativamente à toxicidade e à segurança alimentar, uma vez que muitos dos dados atualmente disponíveis permanecem inconclusivos (Yarmolinsky et al., 2024). Paralelamente, têm sido desenvolvidas diferentes estratégias com o objetivo de aumentar a eficácia desses compostos, destacando-se a nano encapsulação, técnica capaz de melhorar a estabilidade dos compostos e controlar a sua liberação nos alimentos (Davidson et al., 2014).

Apesar desses avanços, a aplicação em escala industrial continua a enfrentar desafios relacionados à estabilidade térmica, variabilidade de eficácia em diferentes matrizes alimentares e os possíveis impactos sensoriais nos produtos finais. Nesse sentido, novas abordagens têm vindo a ser estudadas, incluindo sistemas de liberação controlada e embalagens ativas capazes de incorporar compostos fenólicos e outros bioativos, prolongando sua atividade funcional e ampliando o potencial de aplicação na indústria alimentar (de Oliveira et al., 2025). Estas estratégias representam uma abordagem promissora para ultrapassar limitações tecnológicas e responder à crescente procura por alimentos mais seguros, sustentáveis e *clean label* (Diogo Gonçalves et al., 2025).

Adicionalmente, a harmonização das regulamentações aplicáveis aos conservantes naturais, incluindo métodos de aplicação, concentração e rotulagem, constitui um fator fundamental para garantir a sua utilização segura. Na União Europeia, o Regulamento (CE) n.º 1333/2008 e o Regulamento (UE) n.º 231/2012, estabelecem os aditivos autorizados, respetivas condições de utilização e critérios de pureza. Em Portugal, o Decreto-Lei n.º 121/98 reforça a necessidade de garantir a durabilidade e a segurança dos géneros alimentícios. Paralelamente, a aceitação pelos consumidores constitui um fator determinante para a implementação destas soluções, sendo essencial promover o esclarecimento relativamente aos benefícios e segurança associados aos conservantes naturais enquanto alternativas aos aditivos sintéticos convencionais (Comissão Europeia, 2008b, 2012; Karnwal; Malik, 2024).

Apesar dos avanços observados nos últimos anos, a aplicação de conservantes naturais em contexto industrial continua dependente da otimização dos processos de obtenção, da validação da sua eficácia em diferentes matrizes alimentares e da superação de limitações tecnológicas associadas à estabilidade e padronização dos compostos bioativos. Assim, a

investigação nesta área permanece essencial para promover a integração de soluções naturais e sustentáveis na indústria alimentar.

3. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver e caracterizar um extrato natural rico em compostos bioativos com potencial aplicação como conservante alimentar, recorrendo ao aproveitamento de diferentes matrizes vegetais, incluindo subprodutos agroindustriais (urtiga, bioresíduos de romã e de bróculos). A crescente procura por alternativas naturais aos conservantes sintéticos, associada às exigências da indústria alimentar por soluções mais sustentáveis, seguras e *clean label*, tem impulsionado o interesse científico na valorização de recursos vegetais ricos em compostos fenólicos e outros metabolitos bioativos. Neste contexto, o presente estudo procurou integrar estratégias de valorização de biomassa vegetal com o desenvolvimento de métodos de extração eficientes, capazes de potenciar a recuperação de compostos com elevada atividade antioxidante e antimicrobiana (**Figura 4**).

São considerados objetivos específicos deste trabalho:

- 1) Avaliar a atividade antioxidante, antimicrobiana e potencial citotoxicidade de diferentes matrizes naturais.
- 2) Selecionar o extrato com maior potencial bioativo e ausência de toxicidade.
- 3) Otimizar o processo de extração da matriz selecionada, utilizando como variáveis de resposta a atividade antioxidante, o teor de massa seca (rendimento de extração) e o perfil individual de compostos fenólicos.
- 4) Caracterizar o extrato otimizado quanto à sua composição fenólica e propriedades bioativas.
- 5) Comparar as propriedades bioativas do extrato otimizado com as de um extrato comercial disponível no mercado.

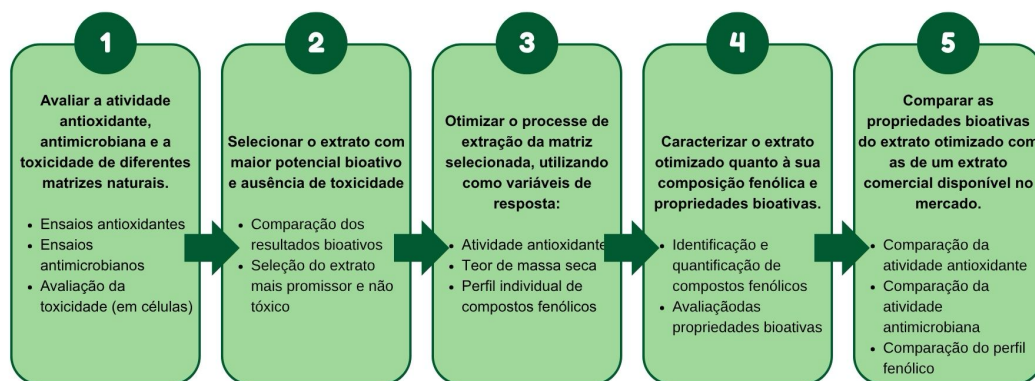


Figura 4. Representação esquemática dos objetivos do estudo.

4. Metodologia

Nas seções a seguir são apresentados os materiais, equipamentos e os procedimentos metodológicos utilizados na realização dos ensaios experimentais e das simulações computacionais desenvolvidas nesse estudo.

4.1. Padrões e reagentes

Atividade antioxidante: Tampão Tris-HCl, ácido ascórbico, FeSO₄, ácido tricloroacético e ácido tiobarbitúrico foram obtidos da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), assim como o padrão trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-carboxílico) e 2,2'-azobis(2-metilpropionamida) di-hidroclorido.

Atividades antibacteriana e antifúngica: Ágar malte foi obtido do *Institute of Immunology and Virology*, Torlak (Belgrade, Serbia). O corante Cloreto de *p*-iodonitrotetrazólio (INT) foi adquirido da Panreac Applichem (Barcelona, Espanha).

Processo de extração: a água foi tratada com um sistema de purificação de água Milli-Q (TGI Pure water Systems, EUA) e o etanol absoluto (99,9%) foi adquirido na empresa Fisher Scientific (Lisboa, Portugal).

Determinação do perfil fenólico: acetato de etilo (99,8%), acetronitrilo (99,9%), etanol absoluto (99,9%) e n-hexano (95%) foram adquiridos na empresa Fisher Scientific (Lisboa, Portugal).

4.2. Aquisição e preparação das matrizes vegetais

As matrizes vegetais utilizadas neste estudo incluíram urtiga, biorresíduos de romã (*Punica granatum* L.) (casca e gromos separadamente) e biorresíduos de brócolos (*Brassica oleracea* var. *italica*) correspondentes a unidades não conformes com os padrões de comercialização, apresentados na **Figura 5**.

A amostra de urtiga, de origem silvestre, foi recolhida na região de Viseu, Portugal. Os biorresíduos de romã e brócolos foram fornecidos por diferentes indústrias agroalimentares sob a forma fresca e posteriormente encaminhados para processamento laboratorial.

Previamente às análises experimentais, todas as amostras foram desidratadas por liofilização (FreeZone 4.5, Labconco, Kansas City, MO, USA), com o objetivo de reduzir o teor de humidade, mas preservar a integridade dos compostos bioativos presentes. Após este processo, as amostras foram trituradas até obtenção de um pó fino e homogéneo e armazenadas

em recipientes devidamente acondicionados, protegidos da luz e da humidade, até à realização das extrações.

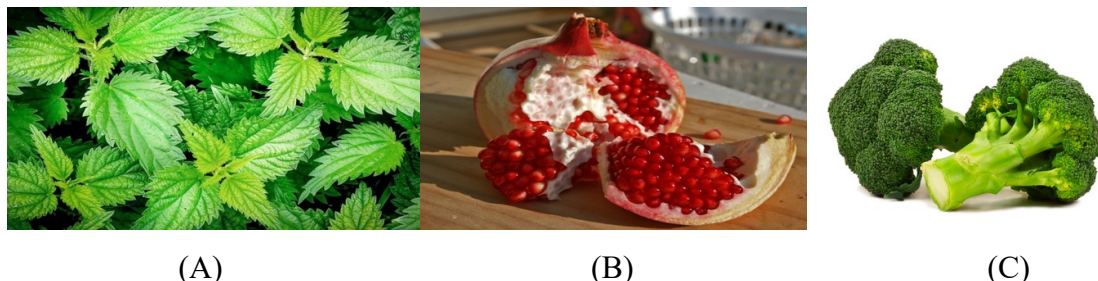


Figura 5. Amostragem utilizada no presente estudo: (A) Urtiga., (B) Bio resíduos de romã e (C) bio resíduos de brócolo.

4.3. Procedimento de extração convencional utilizado para obtenção dos extratos

A partir das matrizes vegetais descritas na *secção 4.2* foram obtidos extratos hidroetanólicos.

Para cada extração, foram pesados 2 g de cada amostra, aos quais se adicionaram 50 mL de solução hidroetanólica (etanol/água, 80:20, v/v). A mistura foi mantida sob agitação contínua durante 1 hora, à temperatura ambiente. Após o período de extração, o extrato obtido foi separado por filtração utilizando papel de filtro Whatman n.º 40 e o resíduo sólido remanescente foi novamente submetido ao processo de extração nas mesmas condições experimentais, mediante adição de mais 50 mL da solução hidroetanólica, com o objetivo de aumentar a eficiência da extração e maximizar a recuperação dos compostos bioativos.

Os filtrados obtidos nas duas etapas de extração foram reunidos e submetidos à remoção da fração alcoólica em evaporador rotativo (Büchi R-210, Flawil, Suíça), a 40 °C e sob pressão reduzida. Posteriormente, a fração aquosa resultante foi congelada e submetida a liofilização, obtendo-se um extrato seco, utilizado nas análises subsequentes. As principais etapas do processo encontram-se esquematicamente representadas na **Figura 6**.

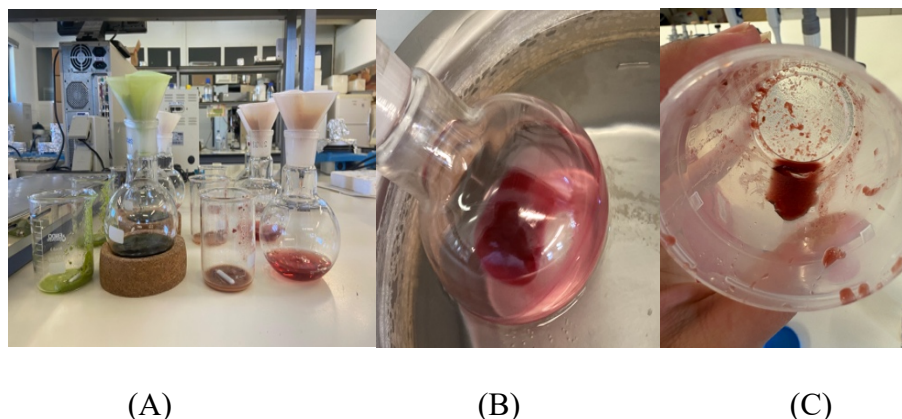


Figura 6. Algumas das etapas do procedimento de extração. Filtração (A), evaporação (B) e extrato (C).

4.4. Caracterização bioativa dos extratos

O potencial bioativo dos extratos hidroetanólicos obtidos a partir das diferentes matrizes vegetais foi avaliado através da determinação da atividade antioxidante e da atividade antimicrobiana. Paralelamente, foi avaliada a citotoxicidade dos extratos, com o objetivo de determinar a segurança da sua potencial aplicação como conservantes naturais na indústria alimentar. Para a realização dos diferentes ensaios, os extratos foram preparados de acordo com as condições experimentais específicas descritas nas subsecções seguintes.

4.4.1. Atividade Antioxidante

O TBARS é a avaliação da capacidade antioxidante com base na sua capacidade de inibir a peroxidação lipídica, de acordo com a metodologia descrita por Barros et al. (2013). O tecido cerebral de porco, obtido no matadouro local, foi dissecado e homogeneizado em tampão Tris-HCl (20 mM, pH 7,4) na proporção de 1:2 (p/v). Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 3000 *rpm* durante 10 minutos para remover detritos celulares.

Uma alíquota de 0,1 mL do sobrenadante foi incubada a 37,5 °C durante 60 minutos com diferentes concentrações da solução testada (0,2 mL), na presença de FeSO₄ (10 µM; 0,1 mL) e ácido ascórbico (0,1 mM; 0,1 mL). Como controlo, utilizou-se a solução etanol/água 80:20 (v/v).

Após o período de incubação, a reação foi interrompida pela adição de ácido tricloroacético (28% p/v, 0,5 mL). Em seguida, acrescentou-se ácido tiobarbitúrico (TBA, 2% p/v, 0,38 mL) e a mistura foi aquecida a 80 °C por 20 minutos. A proteína precipitada foi removida por centrifugação a 3000 rpm durante 5 minutos.

A intensidade da coloração do complexo MDA-TBA presente no sobrenadante foi determinada em espectrofotometro a 532 nm (**Figura 7**). A taxa de inibição da peroxidação lipídica (%) foi calculada de acordo com a **equação 2**.

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

Equação 2. Equação da determinação da taxa de inibição em ensaio TBARS.

Onde:

A é a absorbância do controle

B é a absorbância da solução do composto

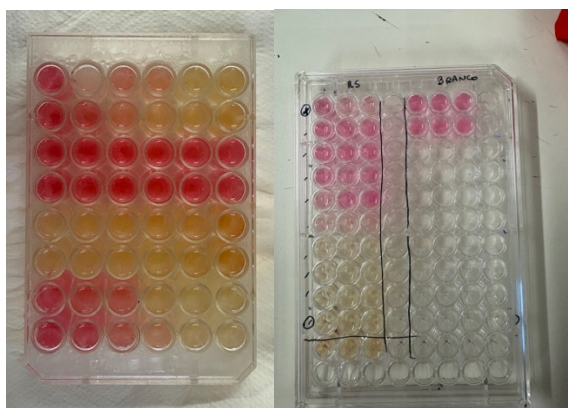


Figura 7. Ensaio avaliativo da inibição da peroxidação lipídica pelo método TBARS.

A atividade antioxidante dos extratos foi também avaliada através do ensaio de Poder Redutor, baseado na capacidade dos compostos antioxidantes presentes na amostra em reduzir o ião férrico (Fe^{3+}) a ião ferroso (Fe^{2+}), conforme descrito por Berker et al. (2007).

Para o ensaio, foram adicionados 500 μL de cada diluição do extrato e do branco (etanol) a tubos Falcon de 15 mL. Em seguida, foram adicionados 500 μL de solução tampão fosfato de sódio (200 mmol/L; pH 6,6) e 500 μL de solução de ferrocianeto de potássio (1%, m/v). Após homogeneização, as misturas foram incubadas a 50°C durante 20 minutos. Posteriormente, foram adicionados 500 μL de ácido tricloroacético (10%, m/v), seguindo-se centrifugação a 6000 rpm durante 2 minutos. Após centrifugação, foi transferido 1 mL do sobrenadante para um novo tubo, ao qual se adicionaram 1 mL de água desionizada e 200 μL de solução de cloreto férrico (0,1%, m/v). Após homogeneização, as amostras foram distribuídas em triplicado numa microplaca e a absorbância foi medida a 690 nm utilizando um leitor de microplacas (Epoch2, BioTek).

A capacidade redutora foi expressa através da concentração eficaz correspondente a uma absorbância de 0,5 (EC_{50}), determinada por interpolação a partir do gráfico de absorbância em função da concentração da amostra (**Figura 8**).

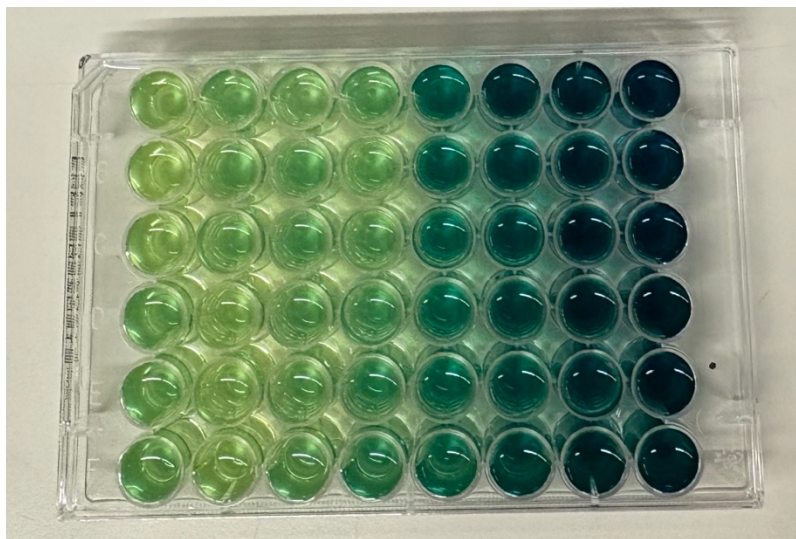


Figura 8. Determinação do Poder Redutor.

A atividade antioxidante dos extratos foi igualmente avaliada através do ensaio de captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), baseado na capacidade dos compostos antioxidantes presentes na amostra em neutralizar este radical estável.

Para o ensaio, foram misturados 30 μ L de diferentes concentrações do extrato (ou etanol como branco) com 270 μ L de solução etanólica de DPPH (6×10^{-5} mol/L). Após homogeneização, as misturas foram mantidas ao abrigo da luz durante 1 hora, à temperatura ambiente.

Após o período de incubação, as misturas reacionais foram transferidas, em triplicado, para uma microplaca e a absorbância foi medida a 517 nm utilizando um leitor de microplacas (Epoch2, BioTek) (**Figura 9**).

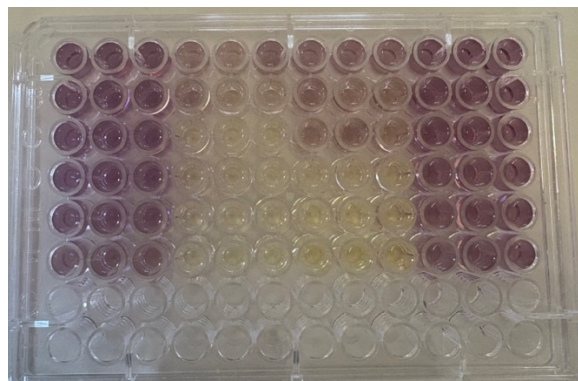


Figura 9. Determinação da atividade antioxidante dos extratos hidroetanólicos pelo método DPPH.

4.4.2. Ação antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos extratos foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo utilizando o corante INT (cloreto de *p*-iodonitrotetrazólio), de acordo com a metodologia descrita por Carochio et al. (2015).

4.4.3. Atividade antibacteriana

Para a avaliação da atividade antibacteriana foram utilizadas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. As bactérias Gram-positivas incluíram *Staphylococcus aureus* (ATCC 11632), *Bacillus cereus* (isolado clínico) e *Listeria monocytogenes* (NCTC 7973), enquanto as Gram-negativas incluíram *Enterobacter cloacae* (ATCC 35030), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella enterica* (ATCC 13311) e *Yersinia enterocolitica*. As estirpes foram obtidas no Laboratório de Micologia do Departamento de Fisiologia Vegetal do Instituto de Investigação Biológica “Siniša Stanković”, da Universidade de Belgrado, na Sérvia.

Foram determinadas a concentração mínima inibitória (CMI) e a concentração mínima bactericida (CMB) dos extratos.

As culturas bacterianas foram ajustadas espectrofotometricamente (625 nm) até atingir uma concentração de aproximadamente 1×10^5 UFC/mL. As diluições do inóculo foram cultivadas em meio sólido para confirmação da ausência de contaminação e validação do inóculo.

Diferentes concentrações dos extratos hidroetanólicos foram adicionadas a poços contendo 100 μ L de caldo de soja tríptico (TSB), seguidas da adição de 10 μ L do inóculo bacteriano. As microplacas foram incubadas durante 24 h a 37 °C.

Posteriormente, foram adicionados 40 µL de solução de INT (0,2 mg/mL), seguindo-se incubação adicional durante 30 minutos a 37 °C. A CMI foi definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento visível dos microrganismos.

A determinação da CMB foi realizada através de subcultura, transferindo 10 µL dos poços sem alteração de coloração para novos poços contendo 100 µL de TSB. Após incubação, a CMB foi definida como a menor concentração na qual não foi observado crescimento bacteriano visível. A ampicilina, estreptomicina e metecilina foram utilizadas como controlo e os resultados foram expressos em mg/mL de extrato hidroetanólico liofilizado.

4.4.4. Atividade antifúngica

A atividade antifúngica foi determinada através da técnica de microdiluição modificada, de acordo com Daouk, Dagher & Sattout (1995) e Espinel-Ingroff (2001).

Foram utilizadas as estirpes fúngicas *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404) e *Aspergillus fumigatus* (ATCC 1022), obtidas no Laboratório de Micologia do Departamento de Fisiologia Vegetal do Instituto de Investigação Biológica “Siniša Stanković”, Universidade de Belgrado, Sérvia.

Os fungos foram mantidos em meio malte-ágar (MA), sendo armazenados a 4 °C e subcultivados mensalmente. Os esporos fúngicos foram removidos da superfície das placas utilizando solução salina estéril (0,85%) contendo Tween 80 (0,1%, v/v). A suspensão de esporos foi ajustada para uma concentração aproximada de 1×10^5 esporos/mL.

A determinação da concentração mínima inibitória (CMI) foi realizada por diluição sucessiva em microplacas de 96 poços. As amostras foram adicionadas ao meio de malte contendo o inóculo fúngico, sendo posteriormente incubadas durante 72 h a 28 °C.

A menor concentração sem crescimento visível foi considerada como CMI. A concentração mínima fungicida (CMF) foi determinada por subcultura dos poços sem crescimento visível para novos poços contendo caldo de malte, seguida de incubação durante 72 h a 28 °C. A menor concentração sem crescimento observável foi definida como CMF.

O aditivo alimentar cetoconazol foi utilizado como controlo positivo, sendo os resultados expressos em mg/mL de extrato hidroetanólico.

4.4.5. Avaliação da citotoxicidade

Para a avaliação do potencial citotóxico do extrato hidroetanólico (80:20; v/v), foi realizado o ensaio de Sulforodamina B (SRB), de acordo com a metodologia descrita por Barros et al. (2013).

Para avaliar a atividade antiproliferativa do extrato, foram utilizadas linhas celulares tumorais humanas: AGS (adenocarcinoma gástrico), CaCo-2 (adenocarcinoma colorretal), MCF-7 (carcinoma da mama) e NCI-H460 (carcinoma do pulmão). Foi ainda utilizada uma linha celular não tumoral, VERO, obtida a partir de rim de macaco-verde-africano. Todas as linhas celulares foram obtidas no Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures.

As linhas celulares tumorais foram mantidas como culturas aderentes em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS), glutamina (2 mM), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL). A linha não tumoral foi mantida em meio DMEM suplementado com 10% de FBS, glutamina (2 mM), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL). As culturas celulares foram incubadas a 37 °C, em atmosfera humidificada contendo 5% de CO₂.

Todos os procedimentos foram realizados em condições assépticas e em câmara de fluxo laminar (TLStar, AV-30/70), de forma a evitar contaminações. Foram testadas concentrações do extrato entre 0,125 e 8 mg/mL, preparadas por diluição em água. Alíquotas de cada concentração do extrato (10 µL) foram incubadas com a suspensão celular (190 µL) das respectivas linhas celulares, em microplacas de 96 poços, durante 72 h, a 37 °C e 5% de CO₂.

As linhas celulares tumorais foram semeadas numa densidade de $1,0 \times 10^4$ células/poço, enquanto a linha não tumoral foi preparada numa densidade de $1,9 \times 10^4$ células/poço. Após o período de incubação, foram adicionados 100 µL de ácido tricloroacético frio (TCA, 10% m/v) a cada poço, seguindo-se incubação durante 60 min a 4 °C. Posteriormente, as microplacas foram lavadas com água desionizada e secas.

Em seguida, adicionaram-se 100 µL de solução de SRB (0,057% m/v), permanecendo as placas em incubação durante 30 min à temperatura ambiente. Após este período, as placas foram lavadas com ácido acético (1% v/v) para remoção do excesso de corante e deixadas a secar ao ar.

A SRB ligada às proteínas celulares foi posteriormente solubilizada com 200 µL de solução Tris (10 mM; pH 7,4), utilizando um agitador de microplacas (Stat Fax-2100). A absorbância foi medida a 540 nm num leitor de microplacas (Bio-Tek ELX800 Inc., Winooski,

EUA), utilizando a elipticina como controlo positivo. Os resultados foram expressos em valores de GI₅₀, correspondentes à concentração da amostra necessária para inibir 50% do crescimento celular, expressa em µg/mL.

4.5. Caracterização do perfil individual de compostos fenólicos

A caracterização do perfil individual de compostos fenólicos foi realizada exclusivamente no extrato que apresentou os resultados mais promissores em termos de atividade antioxidante e atividade antimicrobiana, associado à ausência de citotoxicidade. Esta abordagem permitiu direcionar a caracterização química detalhada para o extrato com maior potencial de aplicação como conservante natural na indústria alimentar.

O perfil individual de compostos fenólicos foi determinado de acordo com Bessada et al. (2016), por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando um sistema Dionex Ultimate 3000 UPLC (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA), apresentado na **Figura 10**, equipado com bomba quaternária, injetor automático mantido a 5 °C, desgaseificador e compartimento de coluna termostaticado, acoplado a um detetor de arranjo de díodos (DAD). A deteção foi realizada a 280, 330 e 370 nm. O sistema encontrava-se ainda acoplado a um espectrómetro de massa (EM) com fonte de ionização por electrospray (ESI).

A separação cromatográfica foi efetuada numa coluna de fase reversa C18 (4,6 × 150 mm; 3 µm; Waters Spherisorb S3 ODS-2, Milford, USA), mantida a 35 °C. Como fases móveis utilizaram-se: (A) ácido fórmico em água (0,1%) e (B) acetonitrilo. O programa de eluição consistiu num gradiente da fase B: 10–15% (5 min), 15–20% (5 min), 20–25% (10 min), 25–35% (10 min) e 35–50% (10 min), seguido de reequilíbrio da coluna durante 10 minutos, a um fluxo de 0,5 mL/min.

A análise por espectrometria de massa foi realizada num espectrómetro Ion Trap Linear LTQ XL (ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA), equipado com fonte ESI. O azoto (50 psi) foi utilizado como gás nebulizante. As condições operacionais incluíram temperatura de 325 °C, tensão de spray de 5 kV, tensão capilar de –20 V e tube lens offset de –66 V. Os espetros foram adquiridos em modo de ião negativo, numa gama de 100–1500 m/z, utilizando energia de colisão de 35 unidades arbitrárias. A aquisição e o tratamento dos dados foram realizados com o software Xcalibur® (ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA).

A identificação dos compostos foi efetuada através da comparação dos tempos de retenção, espetros UV-Vis e espetros de massa com padrões comerciais e com dados previamente descritos na literatura.

Para a quantificação, foram construídas curvas de calibração a partir da injeção de soluções padrão (2,5–100 µg/mL) de ácido clorogénico ($y = 168823x - 161172$), quercetina-3-*O*-rutinósido ($y = 13343x + 76751$) e ácido *p*-cumárico ($y = 301950x + 6966,7$), utilizando os sinais UV-Vis no comprimento de onda correspondente ao máximo de absorção de cada composto. Na ausência de padrões específicos, a quantificação foi realizada com recurso a curvas de calibração de compostos pertencentes à mesma classe fenólica. Os resultados foram expressos em mg de composto por g de extrato (mg/g de extrato).



Figura 10. Sistema cromatográfico HPLC-DAD-ESI/MS utilizado na caracterização do perfil individual de compostos fenólicos.

4.6. Planeamento experimental e otimização do processo de extração assistida por ultrassons

A otimização do processo de extração assistida por ultrassons do extrato selecionado foi realizada através de um delineamento composto central rotacional (DCCR). A escolha desta tecnologia baseou-se em evidências descritas na literatura, que demonstram a sua elevada eficiência na extração de compostos bioativos a partir de matrizes vegetais, permitindo, de forma geral, aumentar a recuperação de compostos fenólicos e de outros metabolitos de interesse quando comparada com métodos convencionais de extração. Este efeito resulta essencialmente do fenómeno de cavitação acústica, caracterizado pela formação e colapso de microbolhas no meio extrator, promovendo a disrupção das estruturas celulares vegetais e favorecendo a transferência de massa entre a matriz e o solvente. Adicionalmente, a extração assistida por ultrassons apresenta vantagens como a redução do tempo de processamento, menor consumo de solventes e maior sustentabilidade do processo.

O planejamento experimental foi desenvolvido considerando três variáveis independentes: potência do ultrassom, tempo de extração e proporção etanol/água utilizada como solvente extrator. Cada fator foi avaliado em níveis codificados (-1, 0 e +1), acrescidos de pontos axiais ($-\alpha$ e $+\alpha$) e de repetições no ponto central, permitindo a estimativa dos efeitos lineares, quadráticos e das interações entre variáveis. O delineamento experimental foi constituído por 17 ensaios, incluindo 8 pontos fatoriais, 6 pontos axiais e 3 repetições no ponto central. Os intervalos experimentais estudados foram definidos com base em ensaios preliminares e em dados reportados na literatura, abrangendo valores entre 100 e 500 W para a potência do ultrassom, 0 a 100% de etanol na composição do solvente extrator e 2 a 15 minutos para o tempo de extração.

Os níveis codificados e os respectivos valores reais das variáveis independentes foram definidos de forma a facilitar a interpretação dos resultados e assegurar a reprodutibilidade experimental. Os ensaios experimentais foram realizados de forma aleatória, segundo uma sequência previamente estabelecida, com o objetivo de minimizar a influência de fatores externos não controlados e reduzir potenciais erros experimentais.

As variáveis respostas avaliadas incluíram a atividade antioxidante determinada pelo método DPPH, expressa em IC_{50} (variável a minimizar), o teor de compostos fenólicos totais e o rendimento em massa seca do extrato. Estas variáveis foram selecionadas por permitirem avaliar simultaneamente a eficiência global do processo de extração, considerando a atividade bioativa do extrato (IC_{50}), a recuperação de compostos fenólicos e o rendimento do processo.

A análise estatística foi realizada considerando um nível de significância de 5%, através de análise de variância (ANOVA), com o objetivo de avaliar a significância dos fatores estudados e ajustar modelos matemáticos representativos. Os pressupostos associados à ANOVA, nomeadamente a normalidade, a homogeneidade das variâncias e a independência dos resíduos, foram avaliados através de testes estatísticos e análise gráfica dos resíduos. Os modelos reduzidos foram obtidos pela exclusão dos termos não significativos, respeitando o princípio da hierarquia dos modelos.

As superfícies de resposta foram construídas com base nos modelos ajustados, permitindo analisar o comportamento das variáveis respostas em função dos fatores estudados. A determinação das condições ótimas foi efetuada através das equações obtidas, recorrendo ao cálculo das derivadas de primeira ordem e à análise da matriz Hessiana, permitindo identificar e classificar os pontos críticos em máximos, mínimos ou pontos de sela.

A otimização simultânea das múltiplas respostas foi realizada através da função de desejabilidade, na qual cada variável resposta foi convertida numa função individual de desejabilidade, de acordo com o objetivo definido para cada parâmetro. Neste contexto, o IC₅₀ foi minimizado, enquanto o teor de compostos fenólicos totais e o rendimento em massa seca foram maximizados. A desejabilidade global foi utilizada para determinar a condição experimental ótima que permitisse satisfazer simultaneamente os critérios estabelecidos.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando os softwares MATLAB (versão 25.2.0.3150157, R2025b) e R (versão 4.5.2), em ambiente RStudio, recorrendo aos pacotes rsm (ajuste de modelos de superfície de resposta), car (análise de variância e diagnóstico dos modelos) e lmtest (avaliação dos pressupostos estatísticos).

4.7. Validação experimental do ponto ótimo

Após a determinação das condições ótimas previstas pelos modelos matemáticos, obtidos através da metodologia de superfície de resposta, foi realizada a validação experimental do ponto ótimo com o objetivo de confirmar a adequação das condições selecionadas e avaliar o desempenho bioativo do extrato obtido.

Para este efeito, foram efetuados ensaios adicionais nas condições de extração definidas como ótimas, correspondentes aos valores de potência do ultrassom, tempo de extração e proporção etanol/água determinados pela função de desejabilidade global. As extrações foram realizadas em triplicado, seguindo o procedimento experimental previamente descrito.

O extrato obtido nas condições otimizadas foi posteriormente caracterizado através da avaliação das suas propriedades antioxidantes, recorrendo aos ensaios TBARS, DPPH e Poder Redutor. Adicionalmente, foi avaliada a atividade antimicrobiana e determinado o perfil individual de compostos fenólicos através da metodologia cromatográfica descrita anteriormente.

Os resultados experimentais obtidos permitiram validar a eficácia das condições ótimas determinadas estatisticamente e confirmar o potencial do extrato otimizado para aplicação como conservante natural.

4.8. Comparação entre o extrato otimizado e um extrato comercial

Com o objetivo de avaliar o desempenho do extrato obtido nas condições otimizadas relativamente a um produto já disponível no mercado, foi efetuada uma comparação entre o extrato otimizado e um extrato comercial de urtiga.

Ambos os extratos foram submetidos às mesmas condições experimentais e analisados relativamente às suas propriedades antioxidantes, recorrendo aos ensaios TBARS, DPPH e Poder Redutor (PR) e à atividade antimicrobiana.

Esta abordagem permitiu avaliar o potencial do processo de extração otimizado e verificar se o extrato desenvolvido apresentava desempenho bioativo comparável ou superior ao produto comercial disponível.

5. Resultados e discussão

5.1. Caracterização bioativa das diferentes matrizes vegetais

5.1.1. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante preliminar dos extratos hidroetanólicos foi avaliada através dos ensaios de TBARS, DPPH e Poder Redutor com o objetivo de selecionar o extrato com maior potencial antioxidante para as etapas subsequentes de otimização. Os resultados obtidos encontram-se apresentados na **Tabela 4**.

Tabela 4. Avaliação da atividade antioxidante dos extratos hidroetanólicos através de diferentes métodos.

Extratos	TBARS (mg/mL)	DPPH (mg/mL)	Poder Redutor (mg/mL)
Urtiga	0,014 ± 0,01 ^a	0,14 ± 0,01 ^a	5,45±0,36 ^c
Brócolo	0,40 ± 0,01 ^b	2,15 ± 0,03 ^b	46,91±0,87 ^d
Casca da romã	0,046 ± 0,002 ^b	2,5 ± 0,1 ^b	1,55±0,04 ^b
Gromos da romã	0,88 ± 0,03 ^c	2,1 ± 0,03 ^b	0,42±0,23 ^a

Os resultados estão expressos em valores de EC₅₀ (mg/mL), apresentados como média ± desvio padrão.

Diferentes letras minúsculas na mesma coluna indicam a existência de diferença significativa (p < 0,05).

Os ensaios realizados evidenciaram diferenças significativas entre os extratos avaliados, demonstrando mecanismos antioxidantes distintos entre as matrizes vegetais analisadas. Nos métodos TBARS, DPPH e Poder Redutor, menores valores de EC₅₀ correspondem a maior atividade antioxidante, uma vez que menores concentrações do extrato são necessárias para atingir 50% da atividade máxima observada.

No ensaio TBARS, verificou-se que o extrato de urtiga apresentou o menor valor de EC₅₀ (0,014 ± 0,01 mg/mL), evidenciando a maior capacidade de inibição da peroxidação lipídica entre os extratos estudados. Este resultado sugere uma elevada presença de compostos bioativos com capacidade antioxidante, nomeadamente compostos fenólicos associados à neutralização de espécies reativas e à interrupção das reações oxidativas em cadeia (Carvalho et al., 2017).

Os extratos de casca de romã e de brócolo apresentaram valores intermédios de EC₅₀, correspondentes a 0,046 ± 0,002 mg/mL e 0,40 ± 0,01 mg/mL, respetivamente, não apresentando diferenças estatisticamente significativas entre si (p < 0,05). A atividade antioxidante observada na casca de romã pode estar associada à presença de compostos fenólicos, taninos hidrolisáveis, antocianinas e ácido elágico, compostos reconhecidos pela sua

capacidade sequestradora de radicais livres (Kalaycıoğlu & Erim, 2017). No caso do brócolo, a atividade antioxidante poderá estar relacionada com a presença de compostos fenólicos e glucosinolatos, descritos na literatura pela sua capacidade de neutralização de espécies reativas de oxigênio e proteção contra o stress oxidativo (Syed et al., 2023).

O extrato de gromos da romã apresentou o maior valor de EC_{50} no ensaio TBARS ($0,88 \pm 0,03$ mg/mL), evidenciando menor capacidade de inibição da peroxidação lipídica. Derakhshan et al. (2018) demonstraram igualmente que os gromos apresentam menor atividade antioxidante quando comparados com outras frações da romã, associando este comportamento a uma menor concentração de compostos fenólicos.

Os resultados obtidos pelo método DPPH complementam a avaliação antioxidante realizada por TBARS, permitindo uma análise mais abrangente da capacidade de neutralização de radicais livres dos extratos. De forma geral, observou-se uma tendência semelhante à verificada no ensaio TBARS, com o extrato de urtiga a apresentar novamente o menor valor de EC_{50} ($0,14 \pm 0,01$ mg/mL), confirmando a sua elevada capacidade antioxidante. Este comportamento sugere que os compostos presentes no extrato atuam eficientemente através de mecanismos de doação de hidrogênio e transferência de elétrões, característicos deste ensaio.

Os restantes extratos apresentaram valores superiores de EC_{50} no DPPH, variando entre 2,1 e 2,5 mg/mL, sem diferenças estatisticamente significativas entre si. Estes resultados sugerem menor eficiência na captura direta de radicais livres, podendo estar relacionados com diferenças qualitativas e quantitativas no perfil fenólico das amostras, nomeadamente na proporção entre flavonoides, taninos e ácidos fenólicos.

Relativamente ao ensaio de Poder Redutor, verificaram-se diferenças significativas entre os extratos analisados. Neste método, o extrato de gromos da romã apresentou o menor valor de EC_{50} ($0,42 \pm 0,23$ mg/mL), evidenciando elevada capacidade de transferência de elétrões quando comparado com os restantes extratos. Apesar de este extrato ter apresentado menor atividade nos ensaios TBARS e DPPH, o resultado obtido no Poder Redutor sugere a presença de compostos com elevada capacidade redutora.

A casca da romã apresentou igualmente elevada capacidade redutora, com valor de EC_{50} de $1,55 \pm 0,04$ mg/mL, reforçando o potencial antioxidante já observado nos restantes ensaios. Este comportamento poderá estar associado à elevada concentração de compostos fenólicos, particularmente taninos e derivados do ácido elágico, conhecidos pela sua capacidade de atuar como agentes redutores.

O extrato de urtiga apresentou um valor intermédio de EC_{50} no ensaio de Poder Redutor ($5,45 \pm 0,36$ mg/mL). Apesar de demonstrar menor capacidade redutora comparativamente aos extratos de romã, a urtiga apresentou desempenho antioxidante superior nos ensaios TBARS e DPPH, sugerindo que os seus compostos bioativos atuam preferencialmente através de mecanismos de neutralização de radicais livres e inibição da peroxidação lipídica.

Por outro lado, o extrato de brócolo apresentou o maior valor de EC_{50} ($46,91 \pm 0,87$ mg/mL), evidenciando a menor capacidade redutora entre os extratos estudados. Este resultado sugere menor eficiência na transferência de eletrões, embora o extrato tenha apresentado atividade antioxidante moderada nos ensaios TBARS e DPPH. Estes resultados demonstram que diferentes métodos antioxidantes avaliam mecanismos distintos de ação antioxidante.

De forma global, a comparação entre os métodos TBARS, DPPH e Poder Redutor demonstra que os extratos apresentam comportamentos antioxidantes distintos em função do mecanismo avaliado. Apesar dos extratos de romã apresentarem elevada capacidade redutora, a urtiga destacou-se pelo desempenho antioxidante mais consistente nos ensaios TBARS e DPPH, evidenciando maior eficácia global na neutralização de espécies oxidantes e na prevenção da peroxidação lipídica. Este desempenho justificou a sua seleção como o extrato mais promissor para as etapas subsequentes de otimização experimental.

5.2. Atividade antimicrobiana

A Tabela 5 apresenta os resultados obtidos para a atividade antibacteriana dos extratos hidroetanólicos de brócolo, urtiga e romã. Os resultados são expressos em termos de concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB), ambas em mg/mL. A CMI corresponde à menor concentração do extrato capaz de inibir o crescimento bacteriano visível, enquanto a CMB representa a menor concentração necessária para promover efeito bactericida.

Os resultados sugerem que os extratos apresentam predominantemente efeito bacteriostático, uma vez que os valores de CMB foram, na maioria dos casos, superiores às concentrações testadas, indicando capacidade de inibição do crescimento bacteriano sem eliminação total das células microbianas.

O extrato de casca de romã apresentou a maior atividade antibacteriana, evidenciada pelos menores valores de CMI frente à maioria das bactérias testadas, tanto Gram-negativas como Gram-positivas. Destacaram-se valores de 0,6 mg/mL para *Yersinia enterocolitica*,

Bacillus cereus e *Listeria monocytogenes*. A elevada atividade observada poderá estar associada ao elevado teor de compostos fenólicos e taninos presentes na casca de romã, reconhecidos pelo seu potencial antimicrobiano e capacidade de interferir com a integridade da membrana celular bacteriana.

Tabela 5. Atividade antibacteriana (CMI e CMB mg/mL) dos extratos.

	Amostras								Controle Positivo					
	Bróculo		Urtiga		Casca da romã		Gromos da romã		Streptomicin 1mg/mL		Methicilin 1mg/mL		Ampicillin 10mg/mL	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
Bactérias gram-negativas														
<i>Enterobacter Cloacae</i>	10	>10	5	>10	2,5	>10	10	>10	0,007	0,007	n.t.	n.t.	0,150	0,150
<i>Escherichia coli</i>	10	>10	10	>10	5	>10	10	>10	0,007	0,007	n.t.	n.t.	0,150	0,150
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>10	>10	5	>10	2,5	>10	10	>10	0,060	0,060	n.t.	n.t.	0,630	0,630
<i>Salmonella enterica</i>	10	>10	10	>10	1,25	>10	10	>10	0,007	0,007	n.t.	n.t.	0,150	0,150
<i>Yersinia enterocolitica</i>	5	>10	10	>10	0,6	>10	10	>10	0,007	0,007	n.t.	n.t.	0,150	0,150
Bactérias gram-positivas														
<i>Bacillus cereus</i>	2,5	>10	10	>10	0,6	>10	10	>10	0,007	0,007	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<i>Listeria monocytogenes</i>	>10	>10	10	>10	0,6	>10	>10	>10	0,007	0,007	n.t.	n.t.	0,150	0,150
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	>10	10	>10	2,5	>10	10	>10	0,007	0,007	0,007	0,007	0,150	0,150

CMI- concentração mínima inibitória; CMB- concentração mínima bactericida; nt – não testado.

O extrato de urtiga apresentou atividade antibacteriana moderada, com valores de CMI de 5 mg/mL para *Enterobacter cloacae* e *Pseudomonas aeruginosa*, enquanto para as restantes bactérias os valores observados foram de 10 mg/mL. Estes resultados sugerem uma menor eficácia antimicrobiana comparativamente ao extrato de casca de romã, embora revelem potencial inibitório relevante.

O extrato de brócolo revelou menor atividade antibacteriana, apresentando valores de CMI geralmente compreendidos entre 5 e 10 mg/mL e ausência de efeito bactericida nas concentrações avaliadas. Em contraste, os antibióticos utilizados como controlo positivo, nomeadamente Streptomycin, Methicillin e Ampicillin, apresentaram valores significativamente inferiores, confirmando a elevada sensibilidade das estirpes bacterianas aos controlos utilizados e validando o método experimental aplicado.

As diferenças observadas entre os extratos poderão estar relacionadas com a composição fitoquímica específica de cada matriz vegetal, particularmente com o teor e diversidade de compostos fenólicos, flavonoides e outros metabolitos secundários com atividade antimicrobiana.

Resultados semelhantes foram descritos por Daoutidou et al. (2021), que avaliaram extratos aquosos e etanólicos de arando (cranberry), arónia negra (black chokeberry) e romã contra estirpes de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*. Os autores observaram variações de suscetibilidade entre as diferentes estirpes bacterianas, verificando-se maior eficácia dos extratos etanólicos para determinadas bactérias, o que reforça a influência do método de extração e da composição química dos extratos na atividade antimicrobiana.

De forma semelhante, Elshafie et al. (2021) avaliaram extratos do exocarpo da casca de romã frente a *Escherichia coli*, *Xanthomonas campestris*, *Bacillus megaterium* e *Clavibacter michiganensis*, verificando inibição significativa do crescimento bacteriano em concentrações entre 5 e 10 mg/mL, com eficácia comparável à de antibióticos de referência. Os autores atribuíram esta atividade à elevada presença de compostos fenólicos e taninos hidrolisáveis.

Relativamente à urtiga, Kagula et al. (2026) demonstraram que o extrato apresentou atividade antibacteriana de largo espectro contra *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Bacillus cereus* e *Pseudomonas aeruginosa*, verificando maior suscetibilidade das bactérias Gram-positivas. Adicionalmente, quando incorporado em puré de batata, o extrato apresentou efeito conservante comparável ao da nisina, reduzindo significativamente o crescimento microbiano durante o armazenamento.

Por fim, Aydin et al. (2023) investigaram a atividade antibacteriana do extrato de *Urtica dioica* L. contra *Campylobacter jejuni*, demonstrando que o extrato foi capaz de inibir e eliminar a bactéria apenas em concentrações relativamente elevadas (≥ 5 mg/mL), evidenciando que a eficácia antimicrobiana depende não apenas da concentração utilizada, mas também da suscetibilidade da estirpe bacteriana e das características químicas do extrato.

5.3. Atividade antifúngica

A **Tabela 6** apresenta os resultados obtidos nos ensaios de atividade antifúngica dos extratos hidroetanólicos. Os resultados são expressos em termos de concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima fungicida (CMF), ambas em mg/mL. A CMI corresponde à menor concentração do extrato capaz de inibir o crescimento fúngico visível, enquanto a CMF representa a menor concentração necessária para promover efeito fungicida.

Tabela 6. Atividade antifúngica dos extratos.

	<i>Aspergillus brasiliensis</i>		<i>Aspergillus fumigatus</i>	
	CMI	CMF	CMI	CMF
Bróculo	>10	>10	5	>10
Urtiga	>10	>10	10	>10
Casca da romã	10	>10	1,25	>10
Gromo da romã	2,500	>10	5	>10
Ketoconazole	0,060	0,130	0,500	1

CMI: concentração mínima inibitória; CMF: concentração mínima fungicida

Os resultados demonstraram diferenças na eficácia antifúngica entre os extratos avaliados e as estirpes fúngicas testadas. De forma geral, observou-se predominância de efeito fungistático, uma vez que os valores de CMF foram, na maioria dos casos, superiores às concentrações máximas testadas, indicando inibição do crescimento fúngico sem eliminação total dos microrganismos.

O extrato de brócolo apresentou atividade antifúngica limitada, com valores de CMI e CMF superiores a 10 mg/mL para *Aspergillus brasiliensis*. Relativamente a *Aspergillus fumigatus*, verificou-se uma CMI de 5 mg/mL, embora a CMF tenha permanecido superior a 10 mg/mL, sugerindo um efeito predominantemente fungistático.

O extrato de urtiga revelou igualmente baixa eficácia antifúngica, apresentando valores de CMI e CMF superiores a 10 mg/mL para *A. brasiliensis* e CMI de 10 mg/mL para *A. fumigatus*. Estes resultados indicam reduzida capacidade fungicida nas condições experimentais utilizadas.

A casca de romã destacou-se pelo maior potencial antifúngico, particularmente contra *A. fumigatus*, apresentando uma CMI de 1,250 mg/mL. Apesar disso, a CMF manteve-se superior a 10 mg/mL, sugerindo capacidade de inibição do crescimento sem efeito fungicida efetivo nas concentrações avaliadas. Para *A. brasiliensis*, observou-se uma CMI de 10 mg/mL, evidenciando atividade moderada.

O extrato de gromos de romã apresentou maior eficácia frente a *A. brasiliensis*, com CMI de 2,500 mg/mL, e atividade moderada contra *A. fumigatus* (CMI de 5 mg/mL). Tal como observado para os restantes extratos, os valores de CMF permaneceram superiores a 10 mg/mL.

O controlo positivo, ketoconazole, apresentou atividade antifúngica significativamente superior, com valores reduzidos de CMI e CMF (0,060 - 0,500 mg/mL e 0,125 - 1 mg/mL, respetivamente), confirmando a sensibilidade das estirpes utilizadas e validando o método experimental aplicado.

As diferenças observadas entre os extratos poderão estar relacionadas com a composição fitoquímica específica de cada matriz vegetal, particularmente com o teor de compostos fenólicos, flavonoides e taninos, reconhecidos pelo seu potencial antifúngico e capacidade de interferir com a integridade da membrana celular fúngica.

Resultados semelhantes foram descritos por He et al. (2024), que avaliaram a atividade antifúngica de extratos vegetais frente a diferentes microrganismos, incluindo *Fusarium oxysporum*, *Gibberella zeae* e *Phytophthora infestans*. Os autores observaram que a eficácia antifúngica dependia da concentração do extrato, sendo o principal mecanismo de ação associado à disrupção da membrana celular e consequente inibição do crescimento microbiano.

Relativamente à urtiga, Sehari et al. (2020) demonstraram atividade antifúngica significativa contra *Aspergillus niger* e *Fusarium oxysporum*, atribuindo este efeito principalmente à presença de álcoois terpénicos capazes de danificar a parede celular dos fungos. Contudo, os autores destacam que a eficácia varia de acordo com o método de extração, composição fitoquímica e espécie fúngica analisada.

No caso da romã, Sateriale et al. (2025) referem que a casca apresenta elevada concentração de compostos fenólicos, como punicalaginas, ácido elágico e ácido gálico, os quais podem atuar sinergicamente na alteração da permeabilidade membranar e na inibição do crescimento fúngico. No entanto, os autores salientam que os mecanismos moleculares envolvidos ainda necessitam de investigação mais aprofundada.

Por fim, Tehranifar et al. (2011) avaliaram diferentes partes da romã, incluindo casca, gromos e folhas, demonstrando que os extratos metanólicos apresentaram elevada capacidade de

inibição do crescimento micelial de *Rhizopus stolonifer* e *Botrytis cinerea*. Os autores verificaram ainda que a eficácia antifúngica dependia da concentração utilizada, observando maior inibição em concentrações mais elevadas dos extratos.

5.4. Citotoxicidade e atividade anti-inflamatória

Os resultados obtidos nos ensaios de citotoxicidade e atividade anti-inflamatória demonstra que os extratos avaliados apresentam diferentes perfis biológicos, evidenciando mecanismos distintos de interação celular. De forma geral, verificou-se que a maioria dos extratos manteve níveis aceitáveis de viabilidade celular em concentrações mais baixas, indicando potencial citocompatibilidade inicial. Contudo, observou-se redução progressiva da atividade metabólica com o aumento da concentração, sugerindo comportamento dose-dependente típico de extratos ricos em compostos bioativos (**Figuras 11, 12 e 13**).

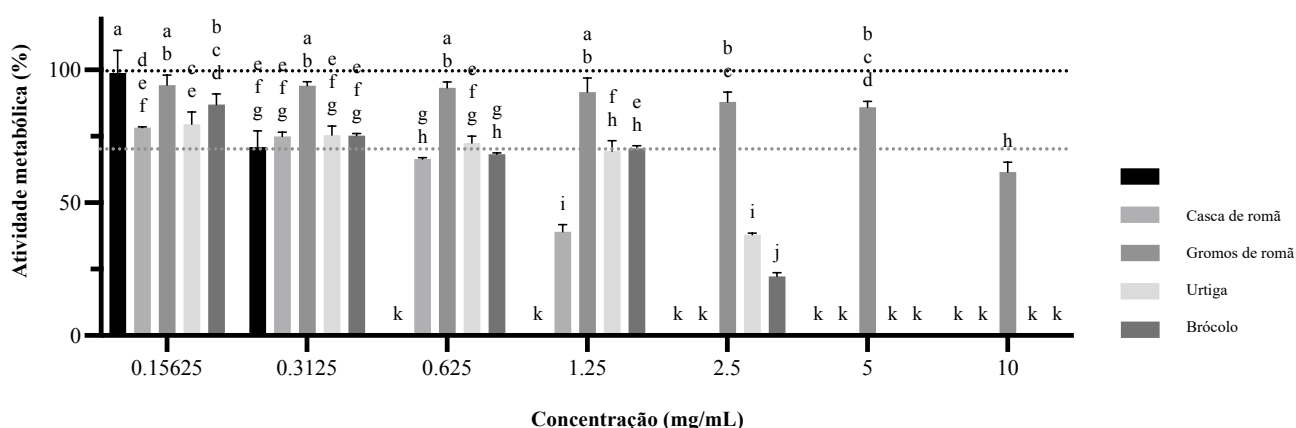


Figura 11. Resultados obtidos para a linha celular AML 12.

A linhagem celular Alpha Mouse Liver (AML12) é um modelo de célula do fígado do camundongo, obtidas a partir de hepatócitos desse animal sem apresentar características tumorais e amplamente utilizadas para estudar metabolismo hepático, toxicidades de compostos e efeitos de extratos naturais (Asar et al., 2026).

Nas células AML12 observou-se redução progressiva da atividade metabólica com o aumento da concentração dos extratos, indicando comportamento dose-dependente. Em concentrações mais baixas os extratos apresentaram boa compatibilidade celular, enquanto concentrações superiores demonstraram potencial efeito tóxico hepático associado à elevada presença de compostos bioativos.

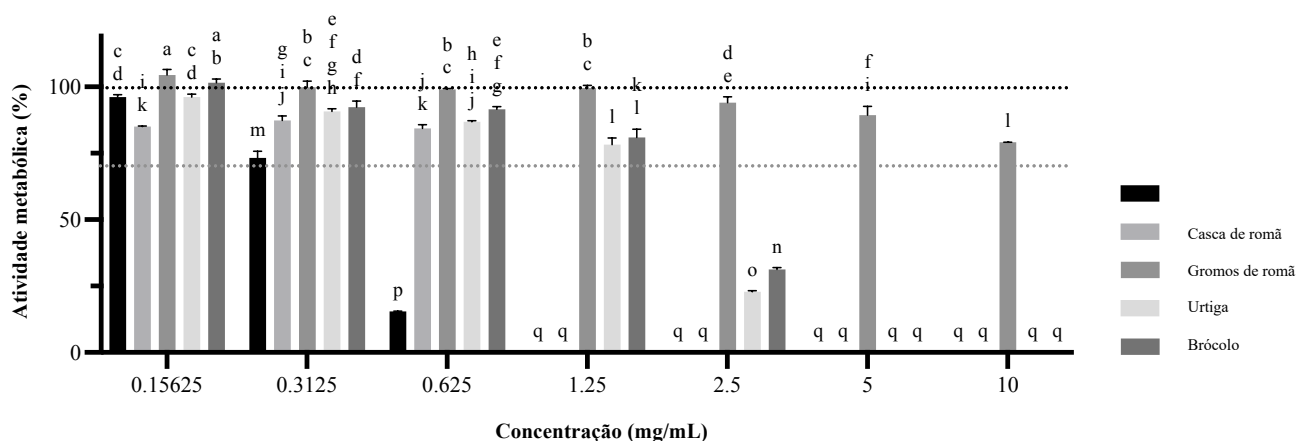


Figura 12. Resultados obtidos para a linha celular Caco-2

A linhagem celular Caco-2 (Cancer coli-2) é uma célula que quando cultivada apresenta características semelhantes à dos enterócitos do intestino delgado, durante o processo, as células formam uma monocamada polarizada e expressam enzimas digestivas típicas do intestino delgado (Kus et al., 2023).

As células Caco-2 apresentaram maior sensibilidade aos extratos, com diminuição significativa da atividade metabólica em concentrações intermédias e elevadas. Apesar disso, alguns extratos mantiveram viabilidade celular adequada em baixas concentrações, sugerindo potencial citocompatibilidade intestinal para aplicações nutracêuticas e alimentares.

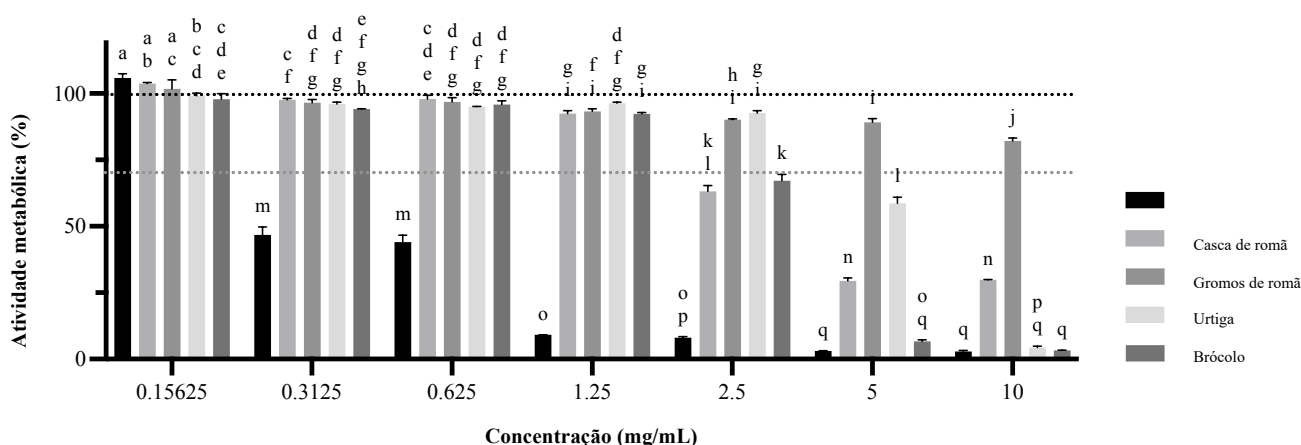


Figura 13. Resultados obtidos para a linha celular RAW 264.7

As células RAW 264.7 são uma linhagem de células semelhantes a monócitos/macrófagos, derivadas de camundongos BALB/c e que apresentam funções típicas de macrófagos como pinocitose, fagocitose, produção de óxido nítrico, assim como a

capacidade de destruir células-alvo por meio de citotoxicidade dependente de anticorpos (Taciak et al., 2018).

As células RAW 264.7 demonstraram maior tolerância aos extratos quando comparadas às restantes linhagens celulares. A manutenção da atividade metabólica em concentrações baixas e intermédias permitiu avaliar a atividade anti-inflamatória sem interferência significativa de efeitos citotóxicos, reforçando o potencial biológico dos extratos avaliados.

Mastrogiovanni et al. (2019) avaliaram o potencial anti-inflamatório de extratos de casca de romã em células Caco-2 e tecidos colónicos, verificando redução significativa de mediadores inflamatórios e supressão de citocinas pró-inflamatórias em modelos estimulados com agentes inflamatórios. Os autores observaram que concentrações entre 2,5 e 25 µg/mL foram capazes de reduzir significativamente a produção de CXCL8, demonstrando que os compostos fenólicos presentes na casca da romã apresentam elevada capacidade de modulação inflamatória em células intestinais.

Du et al. (2019) demonstraram que polifenóis da casca da romã foram capazes de inibir a inflamação em células RAW 264.7 estimuladas com LPS através da supressão da via TLR4/NF-κB. Os autores observaram redução significativa da produção de NO, citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas de oxigénio, sugerindo que os compostos fenólicos presentes no extrato interferem diretamente em vias celulares associadas à resposta inflamatória.

Relativamente ao extrato de gomos da romã, o comportamento observado pode estar relacionado com diferenças qualitativas no perfil fenólico quando comparado à casca da romã. Embora as sementes possuam menor concentração total de fenólicos, alguns compostos presentes podem exercer diferentes efeitos dependente da concentração. Assim, o aumento inicial da produção de NO seguido de redução em concentrações mais elevadas sugere possível efeito hormético associado aos compostos bioativos presentes no extrato semente de romã.

O extrato de urtiga apresentou perfil particularmente interessante devido à redução consistente e dose-dependente da produção de NO, associada à manutenção da viabilidade celular em concentrações não citotóxicas. A literatura descreve que a urtiga possui flavonoides, ácidos fenólicos e compostos antioxidantes capazes de modular mediadores inflamatórios e reduzir a ativação de NF-κB. A atividade observada neste trabalho sugere que os compostos presentes no extrato atuam predominantemente através da modulação da resposta inflamatória sem induzir elevada toxicidade celular, característica particularmente relevante para aplicações nutracêuticas e farmacológicas.

No caso do extrato de brócolos, a atividade anti-inflamatória observada pode estar associada à presença de glucosinolatos e sulforafano, compostos conhecidos pela capacidade de ativar vias antioxidantes endógenas e modular mecanismos inflamatórios celulares. Embora o extrato tenha apresentado menor capacidade antioxidante em alguns ensaios químicos, os resultados celulares sugerem potencial biológico relevante. Este aspecto é importante, uma vez que compostos bioativos presentes no brócolo frequentemente exercem atividade indireta através da indução de enzimas antioxidantes celulares, mecanismo que nem sempre é adequadamente refletido em ensaios químicos convencionais.

5.5. Otimização da extração dos compostos antioxidantes da urtiga

5.5.1. Resposta do planejamento experimental e resposta do DCC

De forma geral, a urtiga foi selecionada como o extrato mais promissor para as etapas subsequentes de otimização devido ao seu desempenho global mais consistente nos diferentes ensaios biológicos realizados. O extrato apresentou os menores valores de EC_{50} nos ensaios TBARS e DPPH, evidenciando elevada capacidade de neutralização de radicais livres e inibição da peroxidação lipídica, além de demonstrar atividade anti-inflamatória relevante através da redução consistente e dose-dependente da produção de NO em células RAW 264.7 estimuladas com LPS, sem induzir elevada citotoxicidade. Embora os extratos de romã tenham apresentado maior atividade antimicrobiana e melhor desempenho no ensaio de Poder Redutor, a urtiga destacou-se pelo perfil biológico mais equilibrado entre atividade antioxidante, modulação inflamatória e citocompatibilidade, justificando a sua escolha como extrato prioritário para os estudos subsequentes.

Para determinação das condições ótimas de extração da urtiga EAU, bem como para avaliação dos efeitos das variáveis independentes sobre a atividade antioxidante (DPPH), no rendimento de extração e no teor de fenólicos totais (FT) dos extratos, empregou-se um delineamento composto central (DCC), inserido na metodologia de superfície de resposta. O planejamento experimental, juntamente com as respostas obtidas nas diferentes condições de extração, encontra-se apresentado na **Tabela 7**. Observa-se que o rendimento variou entre 0,03 e 0,04 e os FT variaram entre 0,22 e 47,57mg/g.

Os valores de IC₅₀ para atividade antioxidante (DPPH) variaram entre -0,08 e 3,09 mg/mL. No ponto experimental 11, foi observado um valor negativo de IC₅₀, o qual não possui significado físico-químico, uma vez que essa variável representa a concentração necessária para inibir 50% da atividade radicalar, devendo, portanto, assumir apenas valores positivos. Esse resultado foi obtido na condição de extração utilizando exclusivamente água (0% etanol), o que indica ausência ou baixa atividade antioxidante mensurável pelo método empregado. Dessa forma, esse valor foi considerado inválido e tratado como dado ausente nas análises estatísticas, a fim de evitar distorções no ajuste dos modelos.

A partir dos dados apresentados, verifica-se que as respostas avaliadas apresentaram variações em função das condições experimentais, indicando a influência das variáveis do processo de extração. Entretanto, para identificar quais fatores exerceram efeito significativo sobre cada resposta, foram calculados a equação das variáveis repostas pelo modelo matemático completo (**Tabela 8**) utilizando a linguagem de programação R. Esse procedimento permitiu a seleção dos termos significativos ($p < 0,05$), bem como a avaliação do efeito (positivo ou negativo) de cada variável sobre a massa seca, compostos fenólicos e a atividade antioxidante dos extratos.

Tabela 7. Planejamento de delineamento composto central (DCC) contendo as variáveis independentes avaliadas e os resultados de rendimento e FT dos extratos.

Ensaio	Variável			Resposta		
	A/W	B/%	C/min	Rendimento de extração	Fenólicos totais/ mg/g	DPPH/ µg/mL
				(Y ₁)	(Y ₂)	(Y ₃)
1	141 (-1)	20 (-1)	5 (-1)	0,030±0,000	6,110±0,145	1172,188±14,807
2	409 (1)	20 (-1)	5 (-1)	0,034±0,002	12,960±0,310	1045,300±38,195
3	141 (-1)	80 (1)	5 (-1)	0,013±0,002	16,000±0,417	810,911±11,572
4	409 (1)	80 (1)	5 (-1)	0,027±0,001	30,190±0,812	352,854 ±3,822
5	141 (-1)	20 (-1)	12 (1)	0,031±0,000	3,310±0,093	1459,798±72,933
6	409 (1)	20 (-1)	12 (1)	0,036±0,002	17,660±0,452	387,862 ±2,989
7	141 (-1)	80 (1)	12 (1)	0,017±0,000	15,250±0,431	626,949 ±24,604
8	409 (1)	80 (1)	12 (1)	0,037±0,000	35,680±1,035	272,050±9,473
9	50 (-1,68)	50 (0)	9 (0)	0,025±0,000	22,820±0,563	328,625±8,119
10	500 (1,68)	50 (0)	9 (0)	0,037±0,000	37,910±1,005	216,716±8,018
11	275 (0)	0 (-1,68)	9 (0)	0,039±0,000	0,220±0,01	-84,591±253,772
12	275 (0)	100 (1,68)	9 (0)	0,009±0,000	3,990±0,114	3087,083±99,243
13	275 (0)	50 (0)	2 (-1,68)	0,031±0,000	39,920±1,078	120,610±3,874
14	275 (0)	50 (0)	15 (1,68)	0,035±0,000	42,200±0,985	247,295±6,702
15	275 (0)	50 (0)	9 (0)	0,035±0,000	46,150±1,3	240,129±6,336
16	275 (0)	50 (0)	9 (0)	0,035±0,000	47,570±1,257	248,113±10,834
17	275 (0)	50 (0)	9 (0)	0,035±0,000	41,000±1,100	254,380±6,617

5.5.2. Ajuste dos modelos matemáticos e análise estatística

Os modelos matemáticos completos para as respostas avaliadas foram determinados por equações polinomiais de segunda ordem, contendo termos lineares, quadráticos e de interação entre as variáveis independentes. Os coeficientes de determinação

R^2 e R^2 ajustado foram utilizados para avaliar a qualidade do modelo do ajuste do modelo matemático aos dados experimentais.

O coeficiente R^2 apresenta a proporção da variabilidade da resposta que é explicada pelo modelo ajustado. Desse modo, para valores de R^2 próximos de 0, indica baixa capacidade de adequação dos dados experimentais ao modelo. No entanto, para valores próximos a 1 desse coeficiente, considera-se que existe um melhor ajuste e maior capacidade preditiva do modelo.

O coeficiente R^2 ajustado é utilizado para avaliar a adequação da regressão de forma mais confiável, especialmente em modelos com múltiplas variáveis. Os elevados valores para ambos os coeficientes demonstram que o modelo utilizado para avaliar os valores experimentais confirmam a adequação das equações ajustas para representar a extração assistida por ultrassom.

A equação (**equação 3**) polinomial de segunda ordem que representa as respostas avaliadas é descrita a seguir:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 A + \beta_2 B + \beta_3 C + \beta_{11} A^2 + \beta_{22} B^2 + \beta_{33} C^2 + \beta_{12} AB + \beta_{13} AC + \beta_{23} BC$$

Equação 3. Equação polinomial de segunda ordem para as respostas.

Onde:

Y corresponde a variável resposta predita pelo modelo;

β_1 , β_2 e β_3 representam os coeficientes lineares;

β_{11} , β_{22} e β_{33} representam os coeficientes quadráticos; e β_{12} , β_{13} e β_{23} representam os coeficientes de interação entre as variáveis independentes.

Tabela 8. Modelo matemático completo.

Resposta	Intercepto	A	B	C	A²	B²	C²	A*B	A*C	B*C	R²	R²adj
Rendimento de extração	0,035	0,0043	-0,007	0,001	-0,002	-0,004	-0,001	0,002	1,000E-3	3,750E-4	0,935	0,850
Fenólicos Totais (mg/g)	45,325	5,949	4,649	0,768	-6,513	-16,526	-2,725	1,679	1,718	0,354	0,953	0,893
DPPH (mg/mL)	278,530	-161,230	-140,370	-30,920	-94,800	893,170	-126,230	48,220	-105,230	13,120	0,853	0,632

O ajuste do modelo matemático completo (**Tabela 9**), permitiu observar que os termos referências às variáveis concentração do etanol (B), tempo de extração (C) e potência (A) apresentaram efeitos significativos sobre o rendimento, sendo que A apresentou efeito positivo e B efeito negativo. Os termos quadráticos, A^2 e B^2 , apresentaram efeitos negativos, indicando a presença de curvatura e a existência de um ponto ótimo.

Para a resposta de fenólicos totais, observou-se que as variáveis A e B exerceram efeitos lineares positivos, enquanto os termos quadráticos, A^2 e B^2 , apresentaram efeitos negativos, evidenciando comportamento não linear e a presença de condições ótimas de extração.

Em relação a atividade antioxidante (DPPH), os termos lineares da potência de A e B apresentaram efeitos negativos, enquanto os demais termos quadráticos associados apresentaram, efeitos positivos, indicando comportamento não linear com tendência à formação de um ponto mínimo, sendo a concentração do etanol a variável de maior influência.

Tabela 9. Tabela ANOVA para os compostos fenólicos

Resposta	A	B	C	A ²	B ²	C ²	A*B	A*C	B*C	Residual
Soma dos quadrados	483,000	294.892	8.046	22.546	23.605	1.003	476.86 2	3070.488	83.464	281.654
Graus de Liberdade	1	1	1	1	1	1	1	1	1	7
Valor F	12,004	7.329	0.200	0.560	0.587	0.025	11.852	76.311	2.074	—
Valor P	0,0148	0,030*	0,668	0,011*	5,176× 10 ⁻⁵	0,193	0,479	0,469	0,879	—
Significância	*	*	ns	*	***	ns	ns	ns	ns	—

* significativo ($p < 0,05$)

** muito significativo ($p < 0,01$)

*** altamente significativo ($p < 0,001$)

. tendência significativa ($0,05 < p < 0,10$)

Tabela 10. Tabela ANOVA para o DPPH.

Resposta	A	B	C	A ²	B ²	C ²	A*B	A*C	B*C	Residual
Soma dos quadrados	354678	176128	13042	96710	5816285	171479	18603	88578	1378	1260616
Graus de Liberdade	1	1	1	1	1	1	1	1	1	6
Valor F	1,6881	0,838	0,062	0,460	27,683	0,816	0,0885	0,422	0,007	—
Valor P	0,242	0,395	0,812	0,523	0,002	0,401	0,776	0,540	0,938	—
Significância	ns	ns	ns	ns	**	ns	ns	ns	ns	—

Tabela 11. Tabela ANOVA para a massa seca.

Resposta	A	B	C	A ²	B ²	C ²	A*B	A*C	B*C	Residual
Soma dos quadrados	2,309× 10 ⁻⁴	0,001	1,782× 10 ⁻⁴	3,370× 10 ⁻⁴	1,9029× 10 ⁻⁴	1,323× 10 ⁻⁴	4,232× 10 ⁻⁴	8,000× 10 ⁻⁸	1,130× 10 ⁻⁶	5,726× 10 ⁻⁶
Graus de Liberdade	1	1	1	1	1	1	1	1	1	7
Valor F	28,2212	82,789	2,1781	4,120	23,263	1,617	5,174	0,009	0,138	—
Valor P	0,001	3,970× 10 ⁻⁴	0,184	0,082	0,002	0,244	0,057	0,924	0,723	—
Significância	**	***	ns	.	**	ns	.	ns	ns	—

Os resultados da análise de variância (**Tabelas 9, 10 e 11**) demonstra diferentes níveis de significância dos termos, uma vez que os efeitos mais relevantes variaram conforme a resposta avaliada. No FT os termos A, B, A², AB e principalmente B² e AC, o que representa forte influência de efeitos lineares, quadráticos e de interação. Na variável resposta DPPH, somente o termo B² foi estatisticamente significativo, enquanto para a massa seca os termos A, B, A², B² e AB tendência de significância.

Os demais termos, para cada resposta, não foram considerados significativos. Esses resultados demonstram que as variáveis estudadas exercem influência significativa no processo de extração assistida por ultrassom de compostos fenólicos da urtiga, demonstrando adequação do modelo quadrático para descrever o comportamento experimental.

Tabela 12. modelo matemático ajustado.

Resposta	Intercepto	A	A ²	B	B ²	R ²	R ² adj
Rendimento de extração	0,034	0,004	-0,001	-0,007	-0,004	0,902	0,869
Fenólicos Totais (mg/g)	41,851	5,950	-5,711	4,649	-15,724	0,892	0,856
DPPH (mg/mL)	222,110	-161,230	17,920	-250,290	525,980	0,803	0,725

A **Tabela 12** apresenta os modelos matemáticos reduzidos às respostas analisadas. Observou-se a influência da percentagem de etanol (A) e da potência (B) sobre o rendimento de extração, FT e a atividade antioxidante. Além disso, a partir dos coeficientes lineares e quadráticos é possível identificar os efeitos individuais e a tendência de comportamento das variáveis dentro da região experimental avaliada.

No rendimento da extração os coeficientes lineares A (0,004) e B (-0,007) apresentam influência moderada das variáveis sobre a resposta. Os coeficientes quadráticos A² (-0,001) e B² (-0,004) indicam comportamento parabólico com tendência a ponto de máximo (**Figura 14**). O R², 0,902, indica que o modelo explica 90,2% dos dados experimentais e o R² ajustado, 0,869, determina o número de termos do modelo mesmo após o ajuste ainda explica 86,9% da variabilidade dos dados.

Os coeficientes lineares para os FT (**Figura 15**), A (5,950) e B (4,649), demonstram influência positiva inicial quando há o aumento da concentração de etanol e da potência no processo de extração dos compostos fenólicos. No entanto, quando os coeficientes quadráticos são avaliados, A² (-5,711) e B² (-15,724), demonstram que elevados valores dessas variáveis

resultaram em redução de resposta, indicando a presença de condições ótimas de extração. Para esse modelo, o ajuste dos dados R^2 explica 89,2% dos dados e R^2 ajustado explica 85,6%.

Em relação ao DPPH (**Figura 16**), que representa a atividade antioxidante, os coeficientes lineares A (-161,230) e B (-15,724) demonstram que o aumento da percentagem de etanol e da potência promoveu redução nos valores da resposta. No entanto, os coeficientes quadráticos A^2 (17,920) e B^2 (525,980) indicam que essa diminuição não ocorreu de modo contínuo, uma vez que, após determinado ponto a resposta voltou a apresentar crescimento. O modelo apresentou o R^2 , 0,803, e o R^2 ajustado, 0,725, indicando que a variabilidade dos dados ainda é explicada pelo modelo, podendo considerar-se que para análises biológicas e químicas frequentemente apresentam maior dispersão dos dados em decorrência dos fatores experimentais.

5.5.3. Superfícies de resposta e determinação do ponto ótimo

Os efeitos das variáveis independentes no rendimento, atividade antioxidante e compostos fenólicos podem ser observados por meio dos gráficos de superfície de resposta tridimensional (**Figura 14, 15 e 16**). Na **Figura 14** observa-se um comportamento parabólico com a formação de um ponto máximo, indicando que ambas as variáveis (A e B) influenciam significativamente a extração, enquanto o tempo não apresentou efeito significativo no modelo ajustado.

A construção das superfícies de resposta foi construída a partir da equação reduzida, motivo pelo qual a variável tempo de extração (C), não foi incluída no modelo final. Observa-se, portanto, que o tempo não apresentou influência significativa sobre as respostas dentro da faixa experimental estudada. Assim, essa conclusão decorre dos resultados da análise de variância (ANOVA), que indicaram ausência de significância estatística para essa variável.

A **Figura 14** apresenta a superfície de resposta tridimensional dos compostos fenólicos demonstra em função da percentagem de etanol e da potência. O ponto ótimo dessa superfície demonstrou que para valores próximos de 54,397 % de etanol e a potência 344,846 W houve um incremento no teor de compostos fenólicos.

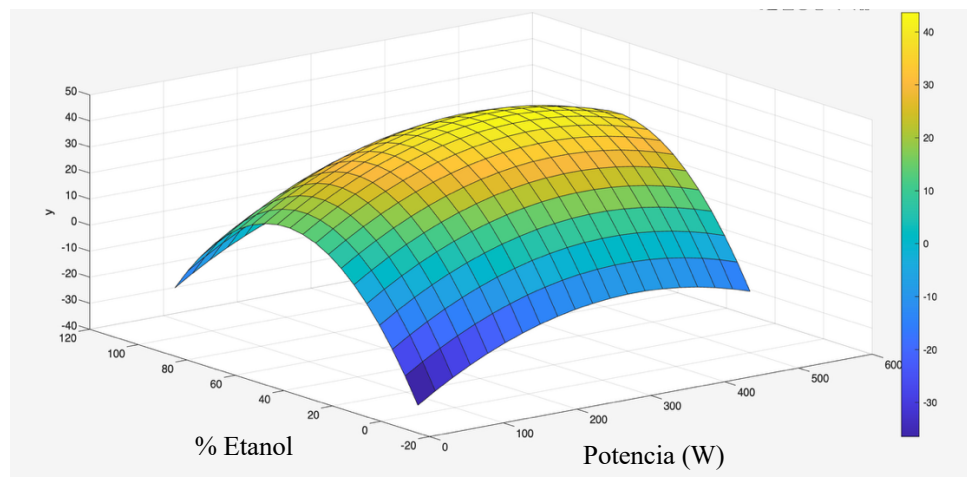


Figura 14. Gráfico de superfície de resposta tridimensional dos compostos fenólicos.

A **Figura 15** apresenta a superfície de resposta do DPPH em função da concentração de etanol (57,081 %) e da potência ultrassônica (500,120 W). A superfície apresenta um comportamento em formato de vale, evidenciando um ponto de mínima resposta (máxima atividade antioxidante) no domínio estudado.

A análise da superfície destaca que a percentagem de etanol é o fator mais crítico sobre a resposta, dada a sua curvatura mais acentuada ao longo do eixo dessa variável, enquanto a potência demonstra um efeito mais gradual sobre o comportamento da resposta.

A interpretação gráfica aponta a existência de uma região de otimização dentro do intervalo experimental investigado. No entanto, a análise matemática do ponto crítico, apresentou um ponto de sela localizado fora da região experimental. Logo, esse ponto não possui interpretação física aplicável às condições avaliadas.

Além disso, a conformidade entre os dados experimentais e a superfície ajustada confirma a adequação do modelo na descrição do comportamento da atividade antioxidante no processo de extração.

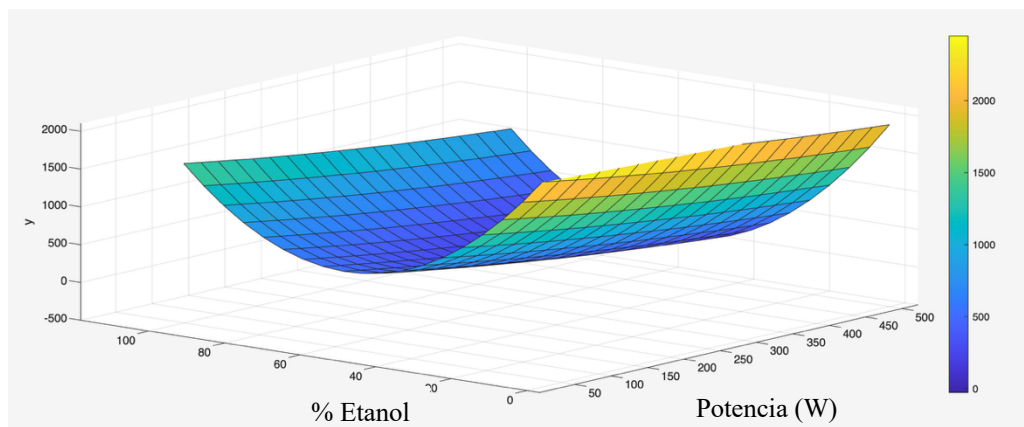


Figura 15. Gráfico de superfície de resposta tridimensional da atividade antioxidante (DPPH).

A superfície de resposta para o rendimento da extração (**Figura 16**) apresenta um perfil de domo, indicando a existência de um ponto de máximo rendimento no domínio estudado. O modelo demonstra que a percentagem de etanol, 22,349 %, é o fator determinante na eficiência da extração, exibindo uma curvatura mais pronunciada que a da potência, 470,128 W, que se mostrou mais robusta. O comportamento convexo revela que, após atingir o ápice, o aumento dos fatores causa um declínio na massa extraída, possivelmente devido à saturação do solvente ou degradação de solutos.,

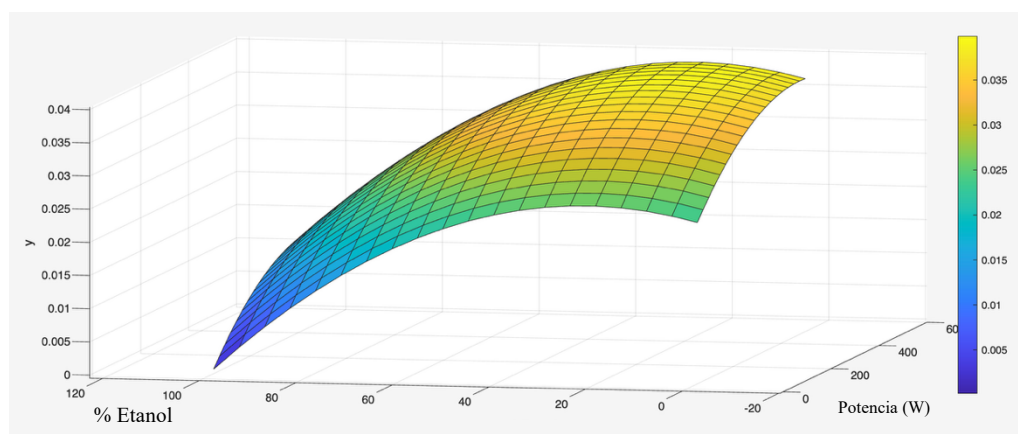


Figura 16. Gráfico de superfície de resposta tridimensional do rendimento de extração.

Vajić et al. (2015) realizaram a otimização do processo de extração da urtiga utilizando a metodologia de resposta de superfície. No seu estudo, além de reportar o DPPH em percentual de inibição, foi reportado um rendimento máximo de compostos fenólicos empregando aproximadamente 54% de metanol em solução aquosa. Foi verificado também uma diminuição no teor de fenólicos com o aumento da proporção de solventes orgânicos, evidenciando um comportamento não linear associado à polaridade do solvente. Esses resultados demonstram que a eficiência da extração está diretamente relacionada ao equilíbrio entre a solubilidade dos

compostos fenólicos e as condições de extração, justificando a presença de um ponto ótimo em concentrações intermediárias de solvente.

Koraqi et al. (2023) avaliaram os perfis obtidos para a extração de urtiga, que também empregaram o delineamento composto central (CCD) para otimizar bioativos da mesma espécie. Enquanto os autores destacam a eficácia de solventes eutécticos profundos (DES), os resultados desta tese demonstram que o sistema hidroetanol, aliado à potência de extração, também permite atingir zonas de máxima eficiência. A sensibilidade observada em relação à concentração do solvente (etanol) reforça a característica da urtiga em exigir uma polaridade específica para a solubilização de seus constituintes majoritários, como o ácido cafeoilímico e a quercetina-3-*O*-rutinosídeo, comuns à espécie.

Nas condições ótimas de extração da urtiga por EAU, o ponto ótimo obtido para a potência (W), percentagem de etanol e tempo são apresentados na **Tabela 13**.

Tabela 13. Ponto ótimo da otimização do extrato de urtiga.

Variável	Valor	Unidade
A máximo	352,813	W
B máximo	52,044	% Etanol
C máximo	10,143	t (min)
Desejabilidade global	96,033	%

Os valores obtidos para as variáveis independentes no ponto ótimo indicam que o extrato de urtiga foi determinado quando a potência, concentração de etanol e tempo de extração são, respectivamente, 352,8 W, 50, 0% e 10,0 min. O favorecimento do equilíbrio entre a eficiência da extração e a preservação dos compostos bioativos acontece devido a atuação desses parâmetros intermediários.

Urango et al. (2021) analisaram o efeito combinado da energia acústica, nas potências de 100, 200, 300 e 400 W, e da variação de temperatura na extração de compostos fitoquímicos da *Foeniculum vulgare*, utilizando o etanol como solvente extrator. O estudo demonstrou que a condição de 300 W associada à temperatura de 60 °C resultou em maior extração de compostos fenólicos. Segundo o estudo, a extração assistida por ultrassom apresentou baixo consumo energético, atribuído ao curto tempo de processamento e ao reduzido volume de etanol empregado no experimento.

Mushtaq et al. (2025) avaliaram o efeito da cavitação acústica promovida pela EAU maximização da recuperação dos compostos bioativos das raízes da *Saussurea costus*. A otimização do processo foi realizada pela metodologia de resposta de superfície (Box-Behnken)

com etanol na proporção de 50% (v/v) como solvente extrator. Os autores observaram a concentração de compostos fenólicos identificadas nesse estudo foram de $66,27 \pm 0,020$ mg GAE/g. Segundo o estudo, a cavitação acústica intensifica a transferência de massa, favorecendo a ruptura celular e facilitando a liberação de fitoconstituintes durante o processo de extração.

Ince et al. (2014) compararam as técnicas EAM e EAU com objetivo de determinar o perfil fenólico obtido e identificar os compostos fenólicos majoritários em cada técnica. Os autores observaram que a extração assistida por micro-ondas obteve um ponto ótimo para extração de compostos fenólicos quando o tempo obtido foi de 10 min. Segundo o estudo, a redução no tempo de extração deve-se ao mecanismo de aquecimento promovido pelas micro-ondas, que aumentam a pressão interna da matriz vegetal, favorecendo a ruptura celular que ocasiona na liberação dos compostos fenólicos.

No estudo de Akalin, Karagöz e Akyüz (2013), onde a aplicação de metodologias de otimização experimental, como a metodologia de superfície de resposta, demonstrou influência significativa das variáveis de processo no rendimento de extração. A extração com etanol foi realizada em condições supercríticas, verificou-se que a temperatura foi o fator mais relevante, sendo possível obter elevados rendimentos de extrato e bom ajuste do modelo matemático ($R^2 \approx 0,94$). Esses resultados corroboram os achados do presente estudo, indicando que a otimização das condições experimentais é determinante para maximizar a recuperação de compostos bioativos.

5.5.4. Extrato de urtiga obtido no ponto ótimo

5.5.4.1 Avaliação da massa seca

A massa seca obtida para o extrato de *Urtica dioica* L foi de $0,029 \pm 6,638 \times 10^{-4}$ g, que corresponde a 0,614%, indicando a presença de compostos solubilizados extraídos durante o processo extrativo. Esse resultado demonstra eficiência das condições otimizadas aplicadas na extração assistida por ultrassom, favorecendo a recuperação de metabólitos presentes na matriz vegetal. A massa seca constitui um parâmetro relevante para avaliação do rendimento extrativo, podendo estar associada à presença de compostos fenólicos, flavonoides e outros constituintes bioativos responsáveis pela atividade antioxidante observada no extrato.

Uğur et al. (2026) foram realizadas avaliações química e biológicas dos extratos de urtiga utilizando etanol e hexano. O estudo demonstrou que o extrato obtido usando metanol como solvente obteve um rendimento de 6,25%, enquanto o que utilizou hexano obteve um rendimento de 2,35%.

5.5.4.2 Atividade antioxidante

A condições ótimas estabelecidas na **Tabela 13** foram aplicadas para obtenção de extrato de urtiga, o qual foi submetido a avaliação da atividade antioxidante, determinação da massa seca, atividade antimicrobiana e caracterização do perfil fenólico do extrato otimizado, tendo sido comparado com um extrato obtido por maceração, para comparação. Adicionalmente, a atividade antioxidante de um extrato comercial de urtiga foi também determinada.

A atividade antioxidante determinada por meio dos métodos PR, TBARS e DPPH é apresentada na **Tabela 14**.

Tabela 14. Avaliação da atividade antioxidante do ponto ótimo do extrato de urtiga

Atividade antioxidante	Ponto ótimo (UAE)	Maceração (extração convencional)	Extrato comercial (Projeto VIIAFOOD, n.d.)
TBARS (Valor de EC_{50} mg/mL)	0,018±0,001	1,02 ±0,03	0,12 ±0,01
Poder Redutor (Valor de EC_{50} mg/mL)	0,14 ±0,03	0,10±0,02	0,16±0,02
DPPH (Valor de EC_{50} mg/mL)	0,121±0,004	0,1±0,1	0,100±0,002

O extrato otimizado obtido por UAE apresentou valor de EC_{50} no ensaio de TBARS de 0,018±0,000 mg/mL, demonstrando atividade antioxidante muito superior aos dois extratos usados como comparação. Já para o ensaio de poder redutor apresentou melhor atividade que o comercial e ligeiramente inferior ao extrato obtido por maceração. Para o DPPH os valores foram no geral semelhantes, demonstrando elevada capacidade antioxidante

As diferenças observadas relativamente ao extrato comercial podem estar relacionadas com fatores como condições de extração, composição do solvente, origem da matéria-prima vegetal e condições ambientais de cultivo.

Mitrović et al. (2024) avaliaram os gromos da urtiga e analisou a atividade antioxidante por meio dos métodos DPPH, poder redutor e PR. O extrato com maior DPPH apresentou um

valor de EC_{50} de $0,73 \pm 0,026$ mg/mL, usando o metanol como solvente extrator. Para o poder redutor, foi obtido um valor de EC_{50} de $5,68 \pm 0,610$ mg/mL. Verificaram que os extratos obtidos usando metanol e etanol 70% demonstraram melhores valores de DPPH, assim como melhor poder redutor e PR maior quando comparados aos valores dos extratos obtidos com metanol e etanol puros.

Flórez, Cazón e Vázquez (2022) avaliaram a atividade antioxidante das folhas de urtiga a partir de ensaios de DPPH, ABTS e compostos fenólicos totais (TPC). Foi observado que, para o DPPH, analisado em percentagem de inibição, apresentou maior valor quando o solvente utilizado foi a água. De forma semelhante, no ensaio ABTS, a utilização de água como solvente, em combinação com o método de extração e o tempo aplicado, promoveu maior eficiência na atividade antioxidante. Relativamente ao TPC, os melhores resultados foram observados com extração assistida por ultrassons, utilizando água como solvente, durante 4 horas. No processo de otimização, os autores verificaram que as condições mais favoráveis para maximizar a atividade antioxidante correspondiam à extração assistida por ultrassons com água, durante 3,15 horas.

García et al. (2021) utilizaram a temperatura e o tempo de duração para determinar o método de secagem mais eficiente para obter maior quantidade de compostos fenólicos e ácido ascórbico. A atividade antioxidante foi avaliada pelo DPPH e PR. A atividade antioxidante foi de modo significativo maior na secagem por bomba de calor (HPD) do que em folhas frescas de urtiga e as secadas pelos métodos de liofilização e secagem em estufa. No entanto, os métodos de secagem se mostraram adversos para extração em água do ácido ascórbico.

Dakhli et al. (2025) avaliaram a atividade antioxidante do extrato aquoso de folhas de urtiga por meio dos ensaios de DPPH, ABTS, PR e a capacidade de quelação de íons de ferro) do extrato das folhas de urtiga, além de investigarem outras atividades biológicas, como a atividade antimicrobiana e anti tumoral. O extrato aquoso de urtiga reduziu a migração e a invasão de células do HCT-116, além de prevenir sua proliferação. Os autores concluíram que esses efeitos podem estar associados à composição fenólica do extrato, embora recomendem estudos adicionais para avaliar o potencial anticancerígeno da planta *in vivo*.

Omer e Mohammed (2024) determinaram a atividade antioxidante utilizando os ensaios de DPPH, poder redutor, capacidade antioxidante total pelo método do fosfomolibdato, atividade de sequestração do radical hidroxila, ensaio de branqueamento do beta-caroteno e atividade quelante de ferro. O estudo demonstrou que as folhas constituem uma importante

fonte de antioxidantes naturais, evidenciando o potencial da urtiga para aplicações na agricultura e na área da saúde.

Com base nos estudos analisados, observa-se que o extrato de urtiga constitui uma fonte promissora de compostos antioxidantes, podendo ser mais amplamente explorado na obtenção de ingredientes funcionais com potencial conservante.

5.5.4.3 Compostos fenólicos

Os perfis fenólicos dos extratos obtidos a partir do extrato de urtiga foram identificados por HPLC-DAD-ESI/MS, com base nos dados cromatográficos de cada pico, considerando tempo de retenção (Tr), comprimento de onda de absorção máxima na região UV-Vis (λ_{max}), íon pseudomolecular ($[M - H]^-$) e fragmentação do íon molecular (MS^n). A identificação preliminar dos compostos foi realizada por comparação desses parâmetros com dados reportados na literatura (**Tabela 15**).

Em ambos os extratos, extração assistida por ultrassom (EAU) no ponto ótimo e maceração, foram identificados 7 compostos, 4 ácidos fenólicos e 3 flavonoides. O extrato obtido por extração assistida por ultrassom (EAU) apresentou a identificação de sete compostos fenólicos, com teor total de 48 ± 1 mg/g de extrato seco. Entre os compostos identificados, foram observados quatro ácidos fenólicos e três flavonoides. Os flavonoides corresponderam à classe majoritária, apresentando concentração total de 32 ± 1 mg/g de extrato seco, enquanto os ácidos fenólicos apresentaram concentração total de $16,8 \pm 0,5$ mg/g.

Na análise realizada, 3 flavonoides foram identificados, o pico **5** ($[M - H]^-$ a m/z 609) foi identificado como quercetina-3-*O*-rutinosídeo com base no seu espectro UV (λ_{max} 352) e a produção do fragmento MS^2 a m/z 301; o pico **6** ($[M - H]^-$ a m/z 463) foi identificado como quercetina-3-*O*-glicosídeo com base no seu espectro UV (λ_{max} 348) e a produção do fragmento MS^2 a m/z 301; e o pico **7** ($[M - H]^-$ a m/z 623) foi identificado como isoramnetina-3-*O*-rutinosídeo com base no seu espectro UV (λ_{max} 356) e a produção do fragmento MS^2 a m/z 315.

O composto majoritário identificado foi a quercetina-3-*O*-rutinosídeo (rutina), com concentração de $20,6 \pm 0,5$ mg/g de extrato seco. Os flavonoides correspondem a uma classe de moléculas envolvidas em funções fisiológicas, principalmente relacionado a propriedade antioxidante (Carrillo-Martinez et al., 2024; Hao et al., 2024). A quercetina-3-*O*-rutinosídeo, a rutina, flavonoide identificado em maior concentração, tem efeito anti-inflamatório por auxiliar

na inibição de COX-2 e de óxido nítrico síntase, no que se diz respeito ao tratamento de doenças vasculares inflamatórias graves (Freitas et al., 2024; Lobo et al., 2021).

Relativamente aos ácidos fenólicos, o pico 1 ($[M-H]^-$ a m/z 353) foi identificado como ácido 3-O-cafeoilquínico, com base no espectro UV (λ_{max} 324 nm) e nos fragmentos MS^2 a m/z 191(100), 179(81), 173(3), 161(3) e 135(10). O pico 2 ($[M-H]^-$ a m/z 311) foi identificado como ácido cafeico pentosídeo, apresentando λ_{max} de 328 nm e fragmento principal MS^2 a m/z 179. O pico 3 ($[M-H]^-$ a m/z 353) foi identificado como ácido cis-3-O-cafeoilquínico, devido ao espectro UV característico (λ_{max} 324 nm) e à formação do fragmento MS^2 a m/z 191. Por fim, o pico 4 ($[M-H]^-$ a m/z 591) foi identificado como ácido dicafeoilmálico, apresentando λ_{max} de 328 nm e fragmento principal MS^2 a m/z 133.

Entre os ácidos fenólicos identificados, o composto presente em maior concentração foi o ácido cis-3-O-cafeoilquínico ($8,500 \pm 0,200$ mg/g de extrato seco), seguido pelo ácido dicafeoilmálico ($6,300 \pm 0,200$ mg/g). Os ácidos fenólicos, por sua vez, também possuem atividade antioxidante, a qual é intensificada pelo processo de varredura de radicais. Esse processo é responsável pela detecção e neutralização de radicais livres por diferentes processos químicos como a transferência de átomo de hidrogênio e transferência de elétron único (Caruso et al., 2022). Assim, esses compostos fenólicos são amplamente reconhecidos pela sua capacidade antioxidante, atuando principalmente na neutralização de radicais livres e na inibição da peroxidação lipídica.

Tabela 15. Compostos fenólicos identificados no extrato de urtiga obtido por EAU nas condições ótimas. Resultados expressos em mg/g (média ± desvio padrão).

Pico	Tr (min)	λ_{max} (nm)	[M] ⁻	Fragmento principal ESI- MS ⁿ (intensidade (%))	Tentativa de identificação	EAU (mg/g)	Maceração (extração convencional)
1	5,34	324	353	191(100),179(81),173(3),161(3),135(10)	Ácido 3- <i>O</i> -cafeioilquínico	1,25±0,03	0,74±0,02
2	5,94	328	311	179(100)	Ácido cafeico pentosídeo	0,67±0,02	0,33±0,01
3	7,81	324	353	191(100),179(9),173(11),161(5)	Ácido cis-3- <i>O</i> -cafeioilquínico	8,5±0,2	4,55±0,09
4	12,11	328	591	133(100)	Ácido dicafeoilmálico	6,3±0,2	2,57±0,07
5	17,66	352	609	301(100)	Quercetina-3- <i>O</i> -rutinosídeo	20,6±0,5	7,9±0,2
6	19,08	348	463	301(100)	Quercetina-3- <i>O</i> -glicosídeo	10,2±0,3	3,3±0,09
7	20,93	356	623	315(100)	Isorramnetina-3- <i>O</i> -rutinosídeo	1,12±0,03	0,27±0,01
					Ácidos fenólicos totais	16,8±0,5	8,2±0,2
					Flavonoides	32±1	11,6±0,3
					Compostos fenólicos	48±1	19,8±0,5

Pinelli et al., (2008) realizaram a extração e análise por HPLC dos compostos fenólicos das folhas, gravetos e fibras têxteis da urtiga. Os autores identificaram a presença dos ácidos clorogénico e 2-O-cafeioilquímico em duas amostras das folhas, que representavam de 71,5 a 76,5% da composição fenólica e logo depois identificaram nos gravetos cerca de 64,4% de compostos fenólicos. Os autores ainda ressaltam que os resultados encontrados são importantes no viés das propriedades biológicas, uma vez que, podem ter ampla aplicação em diferentes setores industriais.

Đurović et al. (2023) caracterizou 28 compostos fenólicos (296,99 mg/g de extrato) no extrato de urtiga. O ácido 5-O-cafeioilquínico (152,38 mg/g por grama de extrato) foi o composto mais abundante obtido na extração Soxhlet (ES), extração assistida por ultrassom e extração assistida por micro-ondas (EAM). A maior concentração de compostos fenólicos foi obtida por ES.

De acordo com Babolhavaeji, Eghlima e Aghamir (2025), foram identificados 4 compostos fenólicos por HPLC, ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido cumárico e rutina. No estudo, foi avaliado diferentes populações de urtiga e os efeitos do estresse hídrico na concentração de compostos fenólicos.

Os compostos fenólicos identificados no estudo de Sahal et al. (2025) a partir de cromatografia líquida de ultra alta eficiência (UHPLC). No total foram 5, ácido gálico, ácido *p*-cumárico, ácido cinâmico, rutina e ácido trans-ferúlico.

No estudo de Kőszegi et al. (2023), foi avaliada a concentração dos compostos fenólicos das raízes e das folhas, extraídos usando água e etanol como solvente, na qual foram identificados 12 no total. Dentre os compostos fenólicos, o mais abundante foi o ácido vanílico (na faixa de 2,2 mg/g e 3,2 mg/g de extrato). Além disso, o estudo identificou 6 flavonoides, sendo a rutina obtida em maior concentração (concentrada na faixa entre 7,0 mg/g e 7,8 mg/g de extrato).

Garofulić et al. (2021) extraiu os compostos fenólicos a partir da EAM, usando a temperatura de extração, tempo de irradiação e potência das micro-ondas como parâmetros avaliativos. Além disso, foram utilizados três solventes de extração nesse estudo, água, etanol 30 % e acetona 30%. A análise estatística identificou que o solvente de extração e a temperatura são responsáveis por influenciar na concentração dos compostos fenólicos totais. Foram identificados 27 compostos fenólicos. O autor destaca nesse estudo o potencial antioxidante pelo ORAC.

5.5.4.4. Atividade antimicrobiana

A **Tabela 16** apresenta os valores de concentração inibitória mínima (CMI) e concentração bactericida mínima (CMB) do extrato de urtiga otimizado frente a diferentes bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bem como dos antibióticos utilizados como controle positivo. Os resultados permitem a comparação da atividade antimicrobiana entre o extrato vegetal e os agentes antimicrobianos de referência.

Tabela 16. Atividade antimicrobiana do extrato de urtiga frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas avaliadas por CMI e CMB.

	Controlo Positivo									
	Extrato ponto ótimo (UAE)		Extrato comercial		Streptomycin 1 mg/mL		Methicilin 1 mg/mL		Ampicillin 10 mg/mL	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
Bactérias gram-negativas										
<i>Enterobacter Cloacae</i>	5	>10	1,25	>10	0,007	0,007	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<i>Escherichia coli</i>	2,500	>10	2,5	>10	0,010	0,010	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5	>10	1,25	>10	0,060	0,060	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<i>Salmonella enterica</i>	5	>10	1,25	>10	0,007	0,007	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<i>Yersinia enterocolitica</i>	5	>10	1,25	>10	0,007	0,007	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
Bactérias gram-positivas										
<i>Bacillus cereus</i>	1,250	>10	0,6	>10	0,007	0,007	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<i>Listeria monocytogenes</i>	2,500	>10	1,25	>10	0,007	0,007	n.t.	n.t.	0,250	0,500
<i>Staphylococcus aureus</i>	5	>10	0,6	>10	0,007	0,007	0,007	0,007	0,250	0,500

*CMI- concentração mínima inibitória; CMB- concentração mínima bactericida; nt – não testado.

A comparação dos resultados com os obtidos para o extrato comercial demonstra que o extrato de urtiga otimizado apresentou atividade antimicrobiana inferior, contudo compatível com a variabilidade descrita para *Urtica dioica*. Os valores de CMI observados para o extrato otimizado variaram entre 1,25 e 5 mg/mL, sendo próximos aos valores relatados na literatura para *Escherichia coli* (CMI = 2,5 mg/mL), mas superiores para a maioria das demais bactérias avaliadas. De acordo com os dados compilados por Harrison et al. (2022), a atividade antimicrobiana da urtiga apresenta grande heterogeneidade, com resultados dependentes da origem do material vegetal, solvente de extração, composição fitoquímica e metodologia experimental empregada. No presente estudo, as bactérias Gram-negativas, como *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* e *Yersinia enterocolitica*,

apresentaram CMI de 5 mg/mL, enquanto na literatura são reportados valores de aproximadamente 1,25 mg/mL para algumas dessas espécies. Essa diferença sugere que fatores relacionados ao processo de extração ou à composição específica do extrato podem influenciar significativamente a eficácia antimicrobiana.

Para as bactérias Gram-positivas, o extrato otimizado apresentou melhor desempenho frente a *Bacillus cereus* (CMI = 1,25 mg/mL) e *Listeria monocytogenes* (CMI = 2,5 mg/mL), corroborando a tendência observada em diversos estudos de maior suscetibilidade deste grupo bacteriano aos extratos vegetais. Entretanto, os valores obtidos ainda foram superiores aos relatados na literatura para algumas cepas de *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*, nas quais foram observadas CMI de aproximadamente 0,6 mg/mL. Essa diferença pode estar associada a variações entre cepas bacterianas, variabilidade do extrato devido a condições de cultivo e concentrações dos compostos fenólicos e flavonoides presentes nos extratos.

Um aspecto relevante é que tanto os resultados de ambos os extratos (ponto ótimo e comercial) quanto os dados da literatura demonstraram ausência de atividade bactericida significativa nas concentrações avaliadas, uma vez que os valores de CMB permaneceram superiores a 10 mg/mL. Essa característica reforça a hipótese de que os compostos bioativos da urtiga atuam predominantemente de forma bacteriostática, inibindo o crescimento microbiano sem promover a eliminação completa das células bacterianas. Dessa forma, os resultados obtidos corroboram as conclusões de Harrison et al. (2022), que indicam um potencial antimicrobiano moderado para *Urtica dioica*, insuficiente para competir com antibióticos convencionais, mas promissor como fonte de compostos bioativos para aplicações complementares na conservação de alimentos, formulações naturais ou estratégias combinadas com outros agentes antimicrobianos.

Nos estudos de Harrison et al. (2022) foi realizada uma revisão sistemática da literatura sobre a atividade antimicrobiana de extratos de urtiga, com foco em ensaios nos quais a concentração inibitória mínima (CMI) foi avaliada frente a patógenos bacterianos de relevância clínica, incluindo *Escherichia Coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*. Os autores analisaram diferentes estudos experimentais e constataram que, embora existam relatos de atividade antimicrobiana in vitro, não há evidências consistentes que indiquem uma atividade antimicrobiana forte ou clinicamente relevante da urtiga quando comparada a agentes antimicrobianos convencionais. Dessa forma, os resultados sugerem que o potencial antimicrobiano da *Urtica dioica* é limitado e altamente dependente do método de extração, concentração e condições experimentais utilizadas.

A **Tabela 17** apresenta os resultados da atividade antifúngica do extrato otimizado de urtiga, expressos em termos de concentração mínima inibitória (CMI) e concentração fungicida mínima (CFM), frente às espécies *Aspergillus brasiliensis* e *Aspergillus fumigatus*. Os valores obtidos foram comparados com o ketoconazol, utilizado como controlo positivo, a fim de avaliar o potencial antifúngico do extrato vegetal em relação a um antifúngico de referência.

Tabela 17. Avaliação da atividade antifúngica do extrato de urtiga (*Urtica* sp.) por CMI e CFM contra *Aspergillus brasiliensis* e *Aspergillus fumigatus*.

	<i>Aspergillus brasiliensis</i>		<i>Aspergillus fumigatus</i>	
	CMI	CFM	CMI	CFM
Extrato ponto ótimo (UAE)	10	>10	10	>10
Extrato comercial	>10	>10	>10	>10
Ketoconazole	0,060	0,125	0,060	0,125

*CMI - concentração inibitória mínima; CMF - concentração mínima fungicida

A comparação entre o extrato de urtiga otimizado e o comercial demonstra uma atividade antifúngica superior do primeiro. Enquanto os valores descritos na literatura indicam concentrações mínimas inibitórias (CMI) e concentrações fungicidas mínimas (CFM) superiores a 10 mg/mL para ambas as espécies de *Aspergillus* avaliadas, o extrato otimizado apresentou CMI de 10 mg/mL para *Aspergillus brasiliensis* e *Aspergillus fumigatus*, evidenciando uma capacidade inibitória que, embora limitada, foi superior à observada em estudos anteriores.

Contudo, em ambos os casos, não foi verificada atividade fungicida nas concentrações testadas, uma vez que os valores de CFM permaneceram superiores a 10 mg/mL. Este resultado sugere que tanto o extrato otimizado como os extratos descritos na literatura atuam predominantemente de forma fungistática, sendo capazes de inibir o crescimento dos fungos sem promover a sua eliminação completa.

A melhoria observada no presente estudo pode estar relacionada com o processo de otimização da extração, que poderá ter favorecido a recuperação de compostos fenólicos, flavonoides e outros metabólitos secundários com potencial antifúngico. Tal hipótese é consistente com a elevada variabilidade de resultados descrita para extratos vegetais, cuja atividade biológica depende fortemente do solvente utilizado, das condições de extração, da origem do material vegetal e da composição química final do extrato.

Apesar do aumento da atividade inibitória relativamente aos dados da literatura, a eficácia do extrato de urtiga permaneceu significativamente inferior à observada para o ketoconazol, que apresentou valores de CMI de 0,060 mg/mL e CFM de 0,125 mg/mL para ambas as espécies avaliadas. Dessa forma, os resultados obtidos corroboram os estudos anteriores ao demonstrar que a urtiga possui potencial antifúngico mensurável, mas ainda limitado quando comparado aos antifúngicos convencionais, sendo o seu uso mais promissor como fonte complementar de compostos bioativos do que como substituto direto dos agentes.

Ferreira & Oliveira (2021) avaliaram as propriedades antifúngicas da urtiga, frente a seis fungos fito patogénicos. O estudo utilizou um extrato preparado com etanol 50% (v/v), posteriormente incorporado em meio ágar batata dextrose (PDA) em diferentes concentrações. Os autores observaram que, no terceiro dia, houve uma redução de 39,9% no crescimento micelial dos fungos avaliados. De acordo com os resultados obtidos, urtiga demonstrou potencial como alternativa sustentável aos fungicidas convencionais, podendo contribuir para a proteção de plantações contra danos causados por fungos patogénicos.

6. Conclusão

A presente dissertação permitiu avaliar diferentes matrizes vegetais com potencial aplicação como fonte de compostos bioativos, tendo a urtiga (*Urtica dioica*) sido selecionada como a mais promissora para o desenvolvimento de um extrato natural com potencial utilização como conservante alimentar. O estudo demonstrou que a valorização de biomassa vegetal e de biorresíduos pode constituir uma estratégia sustentável para a obtenção de ingredientes naturais alinhados com as atuais exigências da indústria alimentar e com o conceito de *clean label*.

O extrato demonstrou elevado potencial bioativo, apresentando teor total de compostos fenólicos de $19,8 \pm 0,50$ mg/g de extrato seco, sendo constituído por $11,6 \pm 0,30$ mg/g de flavonoides e $8,2 \pm 0,20$ mg/g de ácidos fenólicos, evidenciando a relevância da urtiga como fonte natural de compostos bioativos. Entre os compostos identificados, destacaram-se a quercetina-3-*O*-rutinosídeo (rutina), quercetina-3-*O*-glicosídeo e diferentes derivados cafeoilquínicos, reconhecidos pelas suas propriedades antioxidantes e potencial funcional.

Adicionalmente, o extrato evidenciou forte atividade antioxidante, associada principalmente à presença de derivados da quercetina, como a quercetina-3-*O*-rutinosídeo (rutina), quercetina-3-*O*-glicosídeo e isoramnetina-3-*O*-rutinosídeo, bem como ácidos cafeoilquínicos e derivados do ácido cafeico. Estes compostos são reconhecidos pela sua capacidade de neutralização de radicais livres através de mecanismos de transferência de hidrogénio e de elétron único, contribuindo para o potencial antioxidante global do extrato.

Relativamente à composição, verificou-se que os ácidos fenólicos constituíram o grupo predominante em termos de diversidade estrutural, enquanto os flavonoides se destacaram em termos de contribuição quantitativa, com especial relevância para a rutina, composta com maior concentração individual ($7,9 \pm 0,20$ mg/g de extrato seco).

Os resultados obtidos demonstraram ainda que o extrato apresenta atividade antioxidante relevante, atribuída principalmente à elevada presença de flavonoides e ácidos fenólicos, compostos capazes de atuar na neutralização de espécies reativas através de mecanismos de transferência de hidrogénio e eletrão único. Paralelamente, o extrato revelou atividade antimicrobiana moderada frente a diferentes bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bem como atividade antifúngica limitada frente a espécies de *Aspergillus*, apresentando predominantemente efeito bacteriostático e fungistático. Embora os resultados obtidos tenham sido inferiores aos observados para os controlos antimicrobianos convencionais, verificou-se potencial bioativo relevante do extrato otimizado de urtiga

A análise estatística dos resultados cromatográficos e quantitativos confirmou a elevada precisão, repetibilidade e robustez da metodologia analítica aplicada, evidenciada pelos baixos desvios padrão obtidos entre os replicados experimentais, variando entre $\pm 0,010$ e $\pm 0,300$ mg/g de extrato seco. O teor total de compostos fenólicos apresentou variação reduzida ($19,8 \pm 0,50$ mg/g), assim como os valores obtidos para flavonoides ($11,6 \pm 0,30$ mg/g) e ácidos fenólicos ($8,2 \pm 0,20$ mg/g), demonstrando elevada consistência analítica e boa reprodutibilidade do método cromatográfico utilizado. Adicionalmente, os compostos individuais identificados também apresentaram baixa dispersão dos dados, reforçando a confiabilidade das análises quantitativas e a adequação da metodologia para a caracterização do perfil fenólico de urtiga.

A comparação com a literatura evidencia que o perfil fenólico da urtiga é altamente dependente do método de extração e das condições experimentais, sendo que diferentes estudos reportam variações significativas tanto na diversidade como na concentração dos compostos identificados. No presente trabalho, a EAU demonstrou ser uma metodologia eficiente na recuperação de compostos fenólicos bioativos.

Desta forma, os resultados obtidos demonstram que os biorresíduos de urtiga constituem uma fonte promissora de compostos fenólicos com elevado potencial antioxidante, reforçando o seu interesse para aplicações em áreas como a alimentação funcional e conservação natural de alimentos.

Relativamente às perspetivas futuras, recomenda-se a avaliação da aplicação do extrato otimizado de *Urtica dioica* em matrizes alimentares reais, com o objetivo de investigar o seu potencial como conservante natural e ingrediente funcional. Será igualmente importante estudar a estabilidade dos compostos fenólicos durante o processamento e armazenamento alimentar, bem como a influência de diferentes condições ambientais sobre a manutenção da atividade antioxidante e antimicrobiana do extrato.

Adicionalmente, futuras investigações poderão explorar estratégias de encapsulação e sistemas de libertação controlada, visando aumentar a estabilidade, biodisponibilidade e eficácia dos compostos bioativos. Também será relevante aprofundar os mecanismos de ação associados à atividade antioxidante e antimicrobiana, através de estudos moleculares e celulares.

Por fim, recomenda-se a realização de estudos *in vitro* e *in vivo* para avaliação da segurança, bioacessibilidade e potencial funcional do extrato, permitindo ampliar as possibilidades de aplicação industrial de urtiga nas áreas alimentar e nutracêutica.

Referências

- Akalin, M. K., Karagöz, S., & Akyüz, M. (2013). Application of response surface methodology to extract yields from stinging nettle under supercritical ethanol conditions. *The Journal of Supercritical Fluids*, 84, 164–172. <https://doi.org/10.1016/J.SUPFLU.2013.10.004>
- Alaya, I. ben, Pereira, E., Dias, M. I., Pinela, J., Calhelha, R. C., Soković, M., Kostić, M., Prieto, M. A., Essid, F., Caleja, C., Ferreira, I. C. F. R., & Barros, L. (2021). Development of a Natural Preservative from Chestnut Flowers: Ultrasound-Assisted Extraction Optimization and Functionality Assessment. *Chemosensors*, 9(6), 141. <https://doi.org/10.3390/chemosensors9060141>
- Amit, S. K., Uddin, Md. M., Rahman, R., Islam, S. M. R., & Khan, M. S. (2017). A review on mechanisms and commercial aspects of food preservation and processing. *Agriculture & Food Security*, 6(1), 51. <https://doi.org/10.1186/s40066-017-0130-8>
- Asar, D. Y., Kankel, S., Keller, D. T., Hardt, K. S., Schröder-Lange, S. K., Buhl, E. M., Liehr, T., & Weiskirchen, R. (2026). Comprehensive Cytogenetic and Genomic Profiling of the Murine AML12 (Alpha Mouse Liver 12) Hepatocyte Cell Line. *Cells*, 15(5), 390. <https://doi.org/10.3390/CELLS15050390/S1>
- Ault, A. (2004). The Monosodium Glutamate Story: The Commercial Production of MSG and Other Amino Acids. *Journal of Chemical Education*, 81(3), 347. <https://doi.org/10.1021/ed081p347>
- Babolhavaeji, Z. S., Eghlima, G., & Aghamir, F. (2025). Identification of drought-tolerant nettle populations based on growth performance, physiological responses and phenolic compounds. *Industrial Crops and Products*, 238, 122374. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2025.122374>
- Barros, L., Pereira, E., Calhelha, R. C., Dueñas, M., Carvalho, A. M., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). Bioactivity and chemical characterization in hydrophilic and lipophilic compounds of *Chenopodium ambrosioides* L. *Journal of Functional Foods*, 5(4), 1732–1740. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.07.019>
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70–76. <https://doi.org/10.1006/ABIO.1996.0292>
- Berker, K. I., Güçlü, K., Tor, I., & Apak, R. (2007). Comparative evaluation of Fe(III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-

phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. *Talanta*, 72(3), 1157–1165. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2007.01.019>

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)

Briones Alonso, E., Cockx, L., & Swinnen, J. (2018). Culture and food security. *Global Food Security*, 17, 113–127. <https://doi.org/10.1016/j.gfs.2018.02.002>

Carocho, M., Morales, P., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). Natural food additives: Quo vadis? *Trends in Food Science & Technology*, 45(2), 284–295. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2015.06.007>

Carrillo-Martínez, E. J., Flores-Hernández, F. Y., Salazar-Montes, A. M., Nario-Chaidez, H. F., & Hernández-Ortega, L. D. (2024). Quercetin, a Flavonoid with Great Pharmacological Capacity. *Molecules* 2024, Vol. 29, Page 1000, 29(5), 1000. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES29051000>

Caruso, G., Godos, J., Privitera, A., Lanza, G., Castellano, S., Chillemi, A., Bruni, O., Ferri, R., Caraci, F., & Grosso, G. (2022). Phenolic Acids and Prevention of Cognitive Decline: Polyphenols with a Neuroprotective Role in Cognitive Disorders and Alzheimer’s Disease. *Nutrients* 2022, Vol. 14, Page 819, 14(4), 819. <https://doi.org/10.3390/NU14040819>

Chauhan, K., & Rao, A. (2024). Clean-label alternatives for food preservation: An emerging trend. *Heliyon*, 10(16), e35815. <https://doi.org/10.1016/J.HELİYON.2024.E35815>

Cole, M. B., Augustin, M. A., Robertson, M. J., & Manners, J. M. (2018). The science of food security. *Npj Science of Food*, 2(1), 14. <https://doi.org/10.1038/s41538-018-0021-9>

Comissão Europeia. (2008). *Regulamento - 1333/2008* . <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=CELEX%3A32008R1333>

Dakhli, N., López-Jiménez, A., Cárdenas, C., Hraoui, M., Dhaouafi, J., Bernal, M., Sebai, H., & Medina, M. Á. (2025). Urtica dioica Aqueous Leaf Extract: Chemical Composition and In Vitro Evaluation of Biological Activities. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(3), 1220. <https://doi.org/10.3390/IJMS26031220/S1>

Damodaran, S., Parkin, K. L., & Fennema, O. R. (2008). *Química de alimentos de Fennema* (C. Bittencourt, Ed.; 4ª). Taylor & Francis Group, LLC.

Davidson, P. M., Taylor, T. M., & Schmidt, S. E. (2014). Chemical Preservatives and Natural Antimicrobial Compounds. In *Food Microbiology* (pp. 765–801). ASM Press. <https://doi.org/10.1128/9781555818463.ch30>

de Carvalho, N. M., Oliveira, D. L., Costa, C. M., Pintado, M. E., & Madureira, A. R. (2023). Strategies to Assess the Impact of Sustainable Functional Food Ingredients on Gut Microbiota. *Foods*, 12(11), 2209. <https://doi.org/10.3390/foods12112209>

de Oliveira, I., Santos-Buelga, C., Aquino, Y., Barros, L., & Heleno, S. A. (2025). New frontiers in the exploration of phenolic compounds and other bioactives as natural preservatives. *Food Bioscience*, 68, 106571. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2025.106571>

Deshmukh, R. K., & Gaikwad, K. K. (2024). Natural antimicrobial and antioxidant compounds for active food packaging applications. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 14(4), 4419–4440. <https://doi.org/10.1007/s13399-022-02623-w>

Diogo Gonçalves, S., Paiva-Cardoso, M. das N., & Caramelo, A. (2025). Green Preservation Strategies: The Role of Essential Oils in Sustainable Food Preservatives. *Sustainability* 2025, Vol. 17, Page 7326, 17(16), 7326. <https://doi.org/10.3390/SU17167326>

Dong, H., Xu, Y., Zhang, Q., Li, H., & Chen, L. (2024). Activity and safety evaluation of natural preservatives. *Food Research International*, 190, 114548. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2024.114548>

Du, L., Li, J., Zhang, X., Wang, L., Zhang, W., Yang, M., & Hou, C. (2019). Pomegranate peel polyphenols inhibits inflammation in LPS-induced RAW264.7 macrophages via the suppression of TLR4/NF- κ B pathway activation. *Food & Nutrition Research*, 63, 10.29219/fnr.v63.3392. <https://doi.org/10.29219/FNR.V63.3392>

Dwivedi, S., Prajapati, P., Vyas, N., Malviya, S., & Kharia, A. (2017). A Review on Food Preservation: Methods, harmful effects and better alternatives. *Asian Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 3(6), 193–199. <https://ajpp.in/uploaded/p79.pdf>

eCFR :: 21 CFR Part 170 -- Food Additives. (n.d.). Retrieved September 30, 2025, from <https://www.ecfr.gov/current/title-21/chapter-I/subchapter-B/part-170>

El-Saber Batiha, G., Hussein, D. E., Algammal, A. M., George, T. T., Jeandet, P., Al-Snafi, A. E., Tiwari, A., Pagnossa, J. P., Lima, C. M., Thorat, N. D., Zahoor, M., El-Esawi, M., Dey, A., Alghamdi, S., Hetta, H. F., & Cruz-Martins, N. (2021). Application of natural antimicrobials in food preservation: Recent views. *Food Control*, 126, 108066. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108066>

European Food Safety Authority. (2025). *Food additives* | EFSA. <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/food-additives#re-evaluation-of-authorised-food-additives>

Fathi, F., N. Ebrahimi, S., Matos, L. C., P. P. Oliveira, M. B., & Alves, R. C. (2022). Emerging drying techniques for food safety and quality: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 21(2), 1125–1160. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12898>

Faustino, M., Veiga, M., Sousa, P., Costa, E. M., Silva, S., & Pintado, M. (2019). Agro-Food Byproducts as a New Source of Natural Food Additives. *Molecules*, 24(6), 1056. <https://doi.org/10.3390/molecules24061056>

Ferreira, C., & Oliveira, R. (2021). Antifungal Properties of *Urtica dioica* against Six Phytopathogenic Fungi. *Biology and Life Sciences Forum 2021*, Vol. 3, Page 27, 3(1), 27. <https://doi.org/10.3390/IECAG2021-09730>

Flórez, M., Cazón, P., & Vázquez, M. (2022). Antioxidant Extracts of Nettle (*Urtica dioica*) Leaves: Evaluation of Extraction Techniques and Solvents. *Molecules* 2022, Vol. 27, Page 6015, 27(18), 6015. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES27186015>

Food Industry Capacity & Skill Initiative. (2024, May 3). *Importance of Food Preservation: Ensuring Nutrition and Sustainability*. Food Industry Capacity & Skill Initiative. <https://www.ficsi.in/blog/importance-of-food-preservation-ensuring-nutrition-and-sustainability/>

Food Safety Modernization Act (FSMA) | FDA. (n.d.). Retrieved September 30, 2025, from https://www.fda.gov/food/guidance-regulation-food-and-dietary-supplements/food-safety-modernization-act-fsma?utm_source=chatgpt.com

Freitas, P. H. S. de, Santos, L. P. M. dos, Verissimo, J. de C., Sena, S. N. de, Souza, S. C. C. de, & Scio, E. (2024). Inibição da tirosinase e a presença de substâncias bioativas em extratos vegetais: uma revisão integrativa da literatura. *Revista Brasileira Multidisciplinar*, 27(1Supl), 180–201. <https://doi.org/10.25061/2527-2675/ReBraM/2024.v27i1Supl.2161>

García, L. M., Ceccanti, C., Negro, C., De Bellis, L., Incrocci, L., Pardossi, A., & Guidi, L. (2021). Effect of Drying Methods on Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of *Urtica dioica* L. Leaves. *Horticulturae* 2021, Vol. 7, Page 10, 7(1), 10. <https://doi.org/10.3390/HORTICULTURAE7010010>

Garofulić, I. E., Malin, V., Repajić, M., Zorić, Z., Pedisić, S., Sterniša, M., Možina, S. S., & Dragović-Uzelac, V. (2021). Phenolic Profile, Antioxidant Capacity and Antimicrobial Activity of Nettle Leaves Extracts Obtained by Advanced Extraction Techniques. *Molecules* 2021, Vol. 26, Page 6153, 26(20), 6153. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26206153>

Gavahian, M., Chu, Y. H., Lorenzo, J. M., Mousavi Khaneghah, A., & Barba, F. J. (2020). Essential oils as natural preservatives for bakery products: Understanding the mechanisms of

action, recent findings, and applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(2), 310–321. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1525601>

Guillem-Llobat, X. (2011). The sugar industry, political authorities, and scientific institutions in the regulation of saccharin: Valencia (1888–1939). *Annals of Science*, 68(3), 401–424. <https://doi.org/10.1080/00033790.2011.560096>

Halawa, A. (2023). Influence of the traditional food culture of Ancient Egypt on the transition of cuisine and food culture of contemporary Egypt. *Journal of Ethnic Foods*, 10(1), 11. <https://doi.org/10.1186/s42779-023-00177-4>

Hao, B., Yang, Z., Liu, H., Liu, Y., & Wang, S. (2024). Advances in Flavonoid Research: Sources, Biological Activities, and Developmental Prospectives. *Current Issues in Molecular Biology* 2024, Vol. 46, Pages 2884-2925, 46(4), 2884–2925. <https://doi.org/10.3390/CIMB46040181>

Harrison, F., Furner-Pardoe, J., & Connelly, E. (2022). An assessment of the evidence for antibacterial activity of stinging nettle (*Urtica dioica*) extracts. *Access Microbiology*, 4(3), 000336. <https://doi.org/10.1099/ACMI.0.000336>

Ince, A. E., Sahin, S., & Sumnu, G. (2014). Comparison of microwave and ultrasound-assisted extraction techniques for leaching of phenolic compounds from nettle. *Journal of Food Science and Technology*, 51(10), 2776–2782. <https://doi.org/10.1007/S13197-012-0828-3>

Karnwal, A., & Malik, T. (2024). Exploring the untapped potential of naturally occurring antimicrobial compounds: novel advancements in food preservation for enhanced safety and sustainability. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 8, 1307210. <https://doi.org/10.3389/FSUFS.2024.1307210/XML>

Knorr, D., & Augustin, M. A. (2023). Preserving the food preservation legacy. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(28), 9519–9538. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2065459>

Koraqi, H., Qazimi, B., Khalid, W., Stanoeva, J. P., Sehrish, A., Siddique, F., Česko, C., Ali Khan, K., Rahim, M. A., Hussain, I., & Zongo, E. (2023). Optimized conditions for extraction, quantification and detection of bioactive compound from Nettle (*Urtica dioica* L.) using the deep eutectic solvents, ultra-sonication and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-DAD-ESI-MS/MS). *International Journal of Food Properties*, 26(1), 2171–2185. <https://doi.org/10.1080/10942912.2023.2244194>

Kőszegi, K., Végvári, G., Stefanovits-Bányai, Békássy-Molnár, E., & Maráz, A. (2023). Influence of the harvesting seasons on the polyphenol composition and antimicrobial activity

of stinging nettle (*Urtica dioica* L.) extracts. *Acta Alimentaria*, 52(4), 589–600. <https://doi.org/10.1556/066.2023.00156>

Kourkoutas, Y., & Proestos, C. (2020). Food Preservation: Challenges and Efforts for the Future. *Foods*, 9(4), 391. <https://doi.org/10.3390/foods9040391>

Kuo, C.-C., Chen, D., Jiménez-Flores, R., Wick, M., & Campanella, O. (2024). Valorization of byproducts from meat and dairy industries through fermentation to produce peptides. *Sustainable Food Technology*, 2(5), 1469–1475. <https://doi.org/10.1039/D4FB00058G>

Kus, M., Ibragimow, I., & Piotrowska-Kempisty, H. (2023). Caco-2 Cell Line Standardization with Pharmaceutical Requirements and In Vitro Model Suitability for Permeability Assays. *Pharmaceutics*, 15(11). <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS15112523>

Lee, N. K., & Paik, H. D. (2016). Status, Antimicrobial Mechanism, and Regulation of Natural Preservatives in Livestock Food Systems. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 36(4), 547. <https://doi.org/10.5851/KOSFA.2016.36.4.547>

Ligarda-Samanez, C. A., Huamán-Carrión, M. L., Calsina-Ponce, W. C., Cruz, G. D. la, Calderón Huamaní, D. F., Cabel-Moscoso, D. J., Garcia-Espinoza, A. J., Sucari-León, R., Aroquipa-Durán, Y., Muñoz-Saenz, J. C., Muñoz-Melgarejo, M., & Jilaja-Carita, E. E. (2025). Technological Innovations and Circular Economy in the Valorization of Agri-Food By-Products: Advances, Challenges and Perspectives. *Foods*, 14(11), 1950. <https://doi.org/10.3390/foods14111950>

Lisboa, H. M., Pasquali, M. B., dos Anjos, A. I., Sarinho, A. M., de Melo, E. D., Andrade, R., Batista, L., Lima, J., Diniz, Y., & Barros, A. (2024). Innovative and Sustainable Food Preservation Techniques: Enhancing Food Quality, Safety, and Environmental Sustainability. *Sustainability*, 16(18), 8223. <https://doi.org/10.3390/su16188223>

Lobo, V. da S., Malikosky, M., Lopes, A., Gonçalves, A. R., Aguiar, C. M., & Rosa, M. F. da. (2021). Quantificação de flavonoides totais da *Eruca vesicaria* (L.) Cav. cultivada de forma hidropônica na região oeste do Paraná. *Revista Fitos*, 15(Supl 1), 79–92. <https://doi.org/10.32712/2446-4775.2022.1186>

Lucera, A., Costa, C., Conte, A., & Del Nobile, M. A. (2012). Food applications of natural antimicrobial compounds. *Frontiers in Microbiology*, 3(AUG), 28087. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2012.00287/BIBTEX>

Mahiuddin, M., Khan, Md. I. H., Kumar, C., Rahman, M. M., & Karim, M. A. (2018). Shrinkage of Food Materials During Drying: Current Status and Challenges. *Comprehensive*

Reviews in Food Science and Food Safety, 17(5), 1113–1126. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12375>

Martindale, W., & Schiebel, W. (2017). The impact of food preservation on food waste. *British Food Journal*, 119(12), 2510–2518. <https://doi.org/10.1108/BFJ-02-2017-0114>

Mastrogiovanni, F., Mukhopadhyaya, A., Lacetera, N., Ryan, M. T., Romani, A., Bernini, R., & Sweeney, T. (2019). Anti-Inflammatory Effects of Pomegranate Peel Extracts on In Vitro Human Intestinal Caco-2 Cells and Ex Vivo Porcine Colonic Tissue Explants. *Nutrients*, 11(3). <https://doi.org/10.3390/NU11030548>

Mbow, C., Rosenzweig, C., Barioni, L. G., Benton, T. G., Herrero, M., Krishnapilla, M., Liwega, E., Pradhan, P., Rivera-Ferre, M. G., Sapkota, T., Tubiello, F. N., & Xu, Y. (2022). Food security. In *Climate Change and Land* (pp. 437–550). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/9781009157988.007>

Menezes, B., Caleja, C., Calhelha, R. C., Pinela, J., Dias, M. I., Stojković, D., Soković, M., Gonçalves, O. H., Leimann, F. V., Pereira, E., & Barros, L. (2023). Use of Bio-Waste of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (Yerba mate) to Obtain an Extract Rich in Phenolic Compounds with Preservative Potential. *Foods*, 12(17), 3241. <https://doi.org/10.3390/foods12173241>

Mijiti, Y., Yangjian, Subuer, S., Ullah, N., Ismoil, E., Taoerdahong, H., & Rouzi, P. (2025). *Research on Cumin Peptides Using PBS Extraction and Their Multifunctional Bioactivities*. <https://arxiv.org/abs/2502.08264v1>

Mitrović, J., Nikolić, N., Karabegović, I., Savić, S., Petrović, S., Pešić, M., & Šimurina, O. (2024). Evaluation of the solvent effect on the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from the nettle (*Urtica dioica* L.) seeds: application of PCA and regression analyses. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 18(8), 6618–6626. <https://doi.org/10.1007/S11694-024-02675-8/FIGURES/2>

Moreira, B., Pereira, E., Finimundy, T. C., Pinela, J., Calhelha, R. C., Carocho, M., Stojković, D., Sokovic, M., Ferreira, I. C. F. R., Caleja, C., & Barros, L. (2022). Pineapple by-products as a source of bioactive compounds with potential for industrial food application. *Food & Function*, 13(19), 9959–9972. <https://doi.org/10.1039/D2FO00657J>

Munekata, P. E. S., Pateiro, M., Domínguez, R., Nieto, G., Kumar, M., Dhama, K., & Lorenzo, J. M. (2023). Bioactive Compounds from Fruits as Preservatives. *Foods (Basel, Switzerland)*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/FOODS12020343>

Mushtaq, M., Amin, Q. A., Wani, T. A., Hussain, S. Z., Bhat, T. A., Parveen, S., Chaudhary, A. A., A.M.Ali, M., Qadri, T., & Amin, I. (2025). Cavitation-driven extraction: how ultrasound-

induced acoustic cavitation maximizes bioactive compound recovery from *S. costus* roots. *Ultrasonics Sonochemistry*, 122, 107643. <https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2025.107643>

Nieto, G., Martínez-Zamora, L., Peñalver, R., Marín-Iniesta, F., Taboada-Rodríguez, A., López-Gómez, A., & Martínez-Hernández, G. B. (2023). Applications of Plant Bioactive Compounds as Replacers of Synthetic Additives in the Food Industry. *Foods*, 13(1), 47. <https://doi.org/10.3390/foods13010047>

Novais, C., Molina, A. K., Abreu, R. M. V., Santo-Buelga, C., Ferreira, I. C. F. R., Pereira, C., & Barros, L. (2022). Natural Food Colorants and Preservatives: A Review, a Demand, and a Challenge. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(9), 2789–2805. https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.1C07533/ASSET/IMAGES/LARGE/JF1C07533_0003.JPG

Omer, G. A., & Mohammed, L. Y. (2024). Total Phenolic, Flavonoids and Vitamin C Contents with Antioxidant Activity of *Urtica dioica* L. Leaves Growing in Zakho, Kurdistan Region-Iraq. *Baghdad Science Journal*, 21(5), 18. <https://doi.org/10.21123/bsj.2023.8658>

Osazuwa, C., Olaniyi, O. O., Akinyele, B. J., & Akinyosoye, F. A. (2024). Poultry meat preservation with citric acid obtained from the fermentation of wheat straw by *Aspergillus niger*. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 77(2), 10729–10741. <https://doi.org/10.15446/rfnam.v77n2.105711>

Pinelli, P., Ieri, F., Vignolini, P., Bacci, L., Baronti, S., & Romani, A. (2008). Extraction and HPLC analysis of phenolic compounds in leaves, stalks, and textile fibers of *Urtica dioica* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(19), 9127–9132. <https://doi.org/10.1021/JF801552D>

Pisoschi, A. M., Pop, A., Georgescu, C., Turcuș, V., Olah, N. K., & Mathe, E. (2018). An overview of natural antimicrobials role in food. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 143, 922–935. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.11.095>

Plaza, M., Cifuentes, A., & Ibanez, E. (2008). In the search of new functional food ingredients from algae. *Trends in Food Science & Technology*, 19(1), 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.07.012>

Projeto VIIAFOOD. (n.d.). *[Relatório técnico sobre atividade antioxidante, antibacteriana e antifúngica de extratos vegetais]*.

Punia Bangar, S., Chaudhary, V., Thakur, N., Kajla, P., Kumar, M., & Trif, M. (2021). Natural Antimicrobials as Additives for Edible Food Packaging Applications: A Review. *Foods*, 10(10), 2282. <https://doi.org/10.3390/foods10102282>

Rabbani, A., Ayyash, M., D’Costa, C. D. C., Chen, G., Xu, Y., & Kamal-Eldin, A. (2025). Effect of Heat Pasteurization and Sterilization on Milk Safety, Composition, Sensory Properties, and Nutritional Quality. *Foods*, 14(8), 1342. <https://doi.org/10.3390/foods14081342>

Rathee, P., Sehrawat, R., Rathee, P., Khatkar, A., Akkol, E. K., Khatkar, S., Redhu, N., Türkcanoglu, G., & Sobarzo-Sánchez, E. (2023). Polyphenols: Natural Preservatives with Promising Applications in Food, Cosmetics and Pharma Industries; Problems and Toxicity Associated with Synthetic Preservatives; Impact of Misleading Advertisements; Recent Trends in Preservation and Legislation. *Materials*, 16(13), 4793. <https://doi.org/10.3390/ma16134793>

REGULAMENTO (CE) N.º 178/2002. (2022, January 28). *Regulamento (CE) N.º 178/2002 DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO de 28 de Janeiro de 2002, que estabelece os princípios e requisitos gerais da legislação alimentar, cria a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos e estabelece procedimentos em matéria de segurança alimentar*. <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2002R0178:20080325:PT:PDF>

Rosales, T. K. O., & Fabi, J. P. (2023). Valorization of polyphenolic compounds from food industry by-products for application in polysaccharide-based nanoparticles. *Frontiers in Nutrition*, 10. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1144677>

Sahal, A., Hussain, A., Kumar, S., Dobhal, A., Ahmad, W., Chand, K., Richa, R., & Lohani, U. C. (2025). Nettle (*Urtica dioica*) leaves as a novel food: Nutritional, phytochemical profiles, and bioactivities. *Food Chemistry*: X, 28, 102607. <https://doi.org/10.1016/J.FOCHX.2025.102607>

Science Museum. (2019, November 29). *FOOD: A CHEMICAL HISTORY*. Science Museum. <https://www.sciencemuseum.org.uk/objects-and-stories/chemistry/food-chemical-history>

Singh, N., & Yadav, S. S. (2022). A review on health benefits of phenolics derived from dietary spices. *Current Research in Food Science*, 5, 1508–1523. <https://doi.org/10.1016/J.CRFS.2022.09.009>

Singh, R. P., & Desrosier, N. W. (2025). *Food preservation | Definition, Importance, & Methods | Britannica*. Britannica. <https://www.britannica.com/topic/food-preservation>

Sivasankar, B. (2002). Fermented Foods and Food Chemicals. In *FOOD PROCESSING AND PRESERVATION* (6th ed., pp. 120–132). PHI Learning Pvt. Ltd.

Soni, A., Smith, J., Thompson, A., & Brightwell, G. (2020). Microwave-induced thermal sterilization- A review on history, technical progress, advantages and challenges as compared

to the conventional methods. *Trends in Food Science & Technology*, 97, 433–442. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.01.030>

Sun, B., & Wang, J. (2017). Food Additives. In *Food Safety in China* (pp. 186–200). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119238102.ch12>

Sun, L., Zhu, Z., & Sun, D. W. (2023). Regulating ice formation for enhancing frozen food quality: Materials, mechanisms and challenges. *Trends in Food Science & Technology*, 139, 104116. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2023.07.013>

Taciak, B., Białasek, M., Braniewska, A., Sas, Z., Sawicka, P., Kiraga, Ł., Rygiel, T., & Król, M. (2018). Evaluation of phenotypic and functional stability of RAW 264.7 cell line through serial passages. *PloS One*, 13(6). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0198943>

Taylor, J. H. (2010). PART II FROM ONE WORLD TO THE NEXT. In *Journey Through the Afterlife: Ancient Egyptian Book of the Dead* (1st ed., pp. 28–53). Harvard University Press.

Teshome, E., Forsido, S. F., Rupasinghe, H. P. V., & Olika Keyata, E. (2022). Potentials of Natural Preservatives to Enhance Food Safety and Shelf Life: A Review. *The Scientific World Journal*, 2022, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2022/9901018>

Torres Neto, L., Monteiro, M. L. G., da Silva, B. D., Machado, M. A. M., Mutz, Y. da S., & Conte-Junior, C. A. (2024). Ultrasound-Assisted Nanoemulsion Loaded with Optimized Antibacterial Essential Oil Blend: A New Approach against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Salmonella Enteritidis* in Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Fillets. *Foods*, 13(10), 1569. <https://doi.org/10.3390/foods13101569>

Ueda, J. M., Pedrosa, M. C., Fernandes, F. A., Rodrigues, P., Melgar, B., Dias, M. I., Pinela, J., Calhella, R. C., Ivanov, M., Soković, M., Heleno, S. A., Carcho, M., Ineu, R. P., Ferreira, I. C. F. R., & Barros, L. (2021). Promising Preserving Agents from Sage and Basil: A Case Study with Yogurts. *Foods*, 10(3), 676. <https://doi.org/10.3390/foods10030676>

Uğur, Y., Menevşe, İ. N., Dündar, M., Karci, H., Zengin, R., & Güzel, A. (2026). Comparative chemical and biological evaluation of *Urtica dioica* extracts obtained by methanol and hexane: antioxidant, cytotoxic, apoptotic, and antimicrobial potentials. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 26(1), 13-. <https://doi.org/10.1186/S12906-025-05211-3/TABLES/7>

Urango, A. C. M., Strieder, M. M., Silva, E. K., & Meireles, M. A. A. (2021). Thermosonication Process Design for Recovering Bioactive Compounds from Fennel: A Comparative Study with Conventional Extraction Techniques. *Applied Sciences* 2021, Vol. 11, Page 12104, 11(24), 12104. <https://doi.org/10.3390/APP112412104>

- Vajić, U. J., Grujić-Milanović, J., Živković, J., Šavikin, K., Godevac, D., Miloradović, Z., Bugarski, B., & Mihailović-Stanojević, N. (2015). Optimization of extraction of stinging nettle leaf phenolic compounds using response surface methodology. *Industrial Crops and Products*, 74, 912–917. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2015.06.032>
- Varzakas, T., & Tzia, C. (2015). Thermal Processing. In *Handbook of Food Processing: Food Preservation* (pp. 27–56). CRC Press.
- Williams, A. R. (2015, April 5). *Packing Food for the Hereafter in Ancient Egypt*. National Geographic. <https://www.nationalgeographic.com/culture/article/packing-food-for-the-hereafter-in-ancient-egypt#:~:text=Even%20meat%20and%20poultry%20were,they%20would%20a%20human%20body.>
- Woolgar, C. M., D., S., & T., W. (2006). *Food In Medieval England* (C. M. Woolgar, D. Serjeantson, & T. Waldron, Eds.). Oxford University Press Oxford. <https://doi.org/10.1093/oso/9780199273492.001.0001>
- Wu, L., Zhang, C., Long, Y., Chen, Q., Zhang, W., & Liu, G. (2022). Food additives: From functions to analytical methods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(30), 8497–8517. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1929823>
- Wu, Y., Wang, C., Zhang, Z., & Ge, Y. (2022). Subsistence, Environment, and Society in the Taihu Lake Area during the Neolithic Era from a Dietary Perspective. *Land*, 11(8), 1229. <https://doi.org/10.3390/land11081229>
- Yarmolinsky, L., Nakonechny, F., Haddis, T., Khalfin, B., Dahan, A., & Ben-Shabat, S. (2024). Natural Antimicrobial Compounds as Promising Preservatives: A Look at an Old Problem from New Perspectives. *Molecules*, 29(24), 5830. <https://doi.org/10.3390/molecules29245830>
- Zhang, W., Xiao, S., Samaraweera, H., Lee, E. J., & Ahn, D. U. (2010). Improving functional value of meat products. *Meat Science*, 86(1), 15–31. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.04.018>
- Zheng, W., & Wang, S. Y. (2001). Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5165–5170. <https://doi.org/10.1021/jf010697n>

