
Compostos fenólicos a partir de vegetais: uma revisão sobre os métodos de quantificação e avaliação das propriedades antioxidante e antimicrobiana

Phenolic compounds from vegetables: a review of methods for quantifying and evaluating antioxidant and antimicrobial properties

Marília de Almeida Cavalcante

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1447-5723>

Instituto Federal do Amapá, Brasil

e-mail: marilia.cavalcante@yahoo.com.br

Wardsson Lustrino Borges

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2960-0638>

Embrapa Agroindústria Tropical, Brasil

E-mail: wardsson.borges@embrapa.br

Tiago Marcolino de Souza

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4568-7884>

Universidade do Estado do Amapá, Brasil

e-mail: uaitiago@gmail.com

RESUMO

Os compostos fenólicos são obtidos a partir dos vegetais utilizando diferentes métodos de extração, sendo amplamente utilizados por apresentar diversas propriedades biológicas. Neste contexto, a identificação e quantificação desses compostos nos extratos vegetais e o estudo de suas propriedades torna-se importante. Esta revisão tem como objetivo apresentar os diferentes métodos usados identificação e quantificação dos compostos fenólicos bem como da avaliação de suas propriedades biológicas. Os métodos de identificação e quantificação incluem espectrofotometria e cromatografia gasosa e líquida. A partir da pesquisa foi possível demonstrar as principais vantagens e desvantagens dos métodos utilizados para identificação, assim como a descrição da atividade antioxidante e antimicrobiana e os diversos métodos para avaliação.

Palavras-chave: Compostos bioativos; Radical livre, Susceptibilidade microbiana;

ABSTRACT

Phenolic compounds are obtained from vegetables using different extraction methods and are widely used as they have diverse biological properties. In this context, the identification and quantification of these compounds in plant extracts and the study of their properties become important. This review aims to present the different methods used for identifying and quantifying phenolic compounds as well as evaluating their biological properties. Identification and quantification methods include spectrophotometry and gas and liquid chromatography. From the research, it was possible to demonstrate the main advantages and disadvantages of the methods used for identification, as well as the description of the antioxidant and antimicrobial activity and the different methods for evaluation.

Keywords: Bioactive compounds; Free radical; Microbial susceptibility;

INTRODUÇÃO

Os compostos fenólicos são produzidos pelos vegetais no metabolismo secundário através das vias bioquímicas dos ácidos chiquímico e malônico. Apresentam estrutura química constituída por um anel aromático ligado a uma ou mais hidroxilas, podendo ser apresentados na forma de ésteres ou glicosídeos e classificados em fenóis simples, ácidos benzóicos, ácidos cinâmicos, flavonoides, taninos, estilbenos e ligninas (Angelo; Jorge, 2007; Alu'datt et al., 2017).

A síntese desses compostos pode ser influenciada por fatores ambientais como a sazonalidade, o índice pluviométrico, a temperatura, a altitude e o solo e no vegetal podem apresentar as funções como: (i) proteção contra predadores e radiação ultravioleta; (ii) participação nos processos de alopatia em outras espécies e nos processos de detoxificação; e (iii) regulação do crescimento e atrativos para agentes polinizadores (Herrmann; Willens; Janke, 2001; Ron; Wills; Morgan, 2000; Simões et al., 2000).

Para obtenção dos compostos fenólicos a partir das espécies vegetais são utilizados distintos métodos de extração considerando a polaridade da molécula, a natureza do composto, o solvente e o tamanho das partículas. Assim, para a identificação e quantificação desses compostos obtidos no processo de extração são utilizados métodos espectrofotométricos e cromatográficos. A escolha do método deverá ser feita considerando as desvantagens e limitações de cada método e o composto de interesse (Cong-Cong et al., 2017).

Os métodos espectrofotométricos são simples, de baixo custo, amplamente utilizados, e permitem a quantificação das diferentes estruturas químicas das classes dos compostos fenólicos; no entanto, não permite a quantificação individual de cada composto. Os métodos cromatográficos utilizados na separação, quantificação e identificação dos compostos fenólicos são conhecidos pela alta sensibilidade e seletividade (Angelo; Jorge, 2006; Gogia et al., 2014; Cong-Cong et al., 2017).

Os compostos fenólicos são amplamente utilizados por apresentarem atividades biológicas tais como a antioxidante e a antimicrobiana. A atividade antioxidante consiste na capacidade do composto em inibir ou bloquear os processos oxidativos causados pelas espécies reativas de oxigênio, tais como ânion superóxido, radical hidroxila, óxido nítrico, peróxido de hidrogênio e radical lipídico, protegendo as moléculas de lipídeos,

proteínas e carboidratos que são os principais alvos do processo de oxidação (Matkowski, 2008; Reische; Lillard; Eitenmiller, 2008).

Diversos métodos instrumentais, como colorimétricos, biológicos e eletroquímicos, são utilizados para determinar a atividade antioxidante dos compostos fenólicos e apresentam como princípio a elucidação do mecanismo de ação dos compostos através da captura dos radicais livres; da doação de átomos de hidrogênio ou elétron; da captura do oxigênio singlete; da inibição de enzimas oxidantes ou quelação de íons metálicos (Pietta, 2000; Paixão et al., 2007; Maqsood; Benjakul, 2010).

Compostos fenólicos com atividade antimicrobiana podem inibir o crescimento de bactérias e fungos a nível molecular ou no processo metabólico ou na estrutura celular e são classificados conforme estrutura química ou modo de ação (Taveira et al., 2008). A atividade antimicrobiana de substâncias puras ou extratos vegetais pode ser determinada através do teste de susceptibilidade por difusão em disco e pela determinação da concentração mínima inibitória (CMI) (Alves et al., 2008).

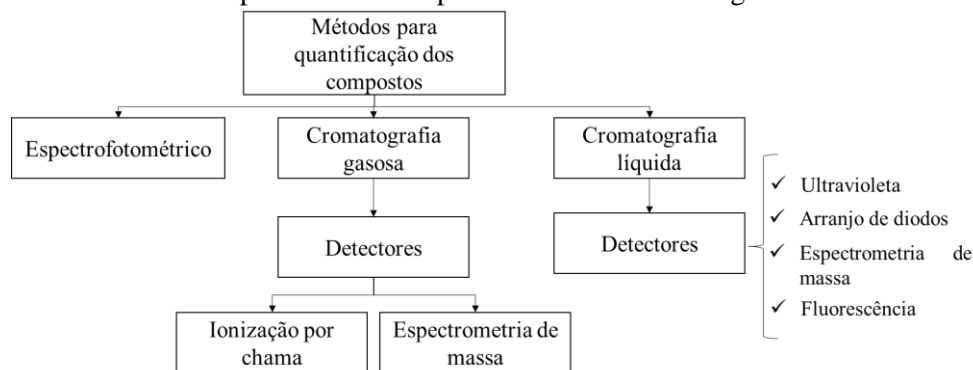
Neste contexto, esta revisão possui como objetivo apresentar uma revisão sobre os métodos para quantificação e identificação dos compostos fenólicos obtidos a partir de vegetais; assim como as propriedades antioxidantes e antimicrobianas e dos métodos para avaliação.

QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS

Para o estudo qualitativo e quantitativo dos compostos fenólicos obtidos através dos processos extrativos são empregados métodos rápidos, sensíveis e confiáveis tais como espectrofotometria, cromatografia e suas combinações. Os métodos espectrofotométricos podem quantificar de maneira global os compostos; enquanto a identificação do composto de maneira individual pode ser feita através da cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography* - HPLC) ou espectrometria de massa. A eletroforese capilar e espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) também são técnicas avançadas aplicadas para a quantificação dos compostos fenólicos. As principais vantagens de cada método, assim como as limitações, devem ser comparadas e consideradas na determinação do perfil dos compostos bioativos em matrizes vegetais (Cong-Cong et al., 2017). Na Figura 1 é demonstrado o fluxograma

dos métodos analíticos empregados na determinação e quantificação dos compostos bioativos presentes em matrizes vegetais.

Figura 1 - Fluxograma dos principais métodos analíticos utilizados na quantificação dos compostos bioativos presentes em matrizes vegetais.



Fonte: Cong-Cong et al., 2017.

A espectrofotometria são métodos simples, de baixo custo e consiste na determinação das diferentes estruturas de cada classe do composto bioativo oriunda dos processos de separação (Gogia et al., 2014). Um exemplo de método espectrofotométrico amplamente utilizado na quantificação de compostos bioativos, como os fenólicos, é o *Folin-Ciocalteu*. Este método consiste basicamente em reações de redução utilizando-se reagentes que contêm tungstênio e molibdênio (Reagente *Folin-Ciocalteu*). Após a reação química, a absorbância do produto é determinada e a quantificação do composto é realizada através de uma curva de calibração com padrão de ácido gálico (Gogia et al., 2014; Pouraboli et al., 2016; Kremer et al., 2015).

O conteúdo em flavonoides totais pode ser determinado através da metodologia espectrofotométrica proposta por Zhishen et al. (1999) e Zou et al. (2004). O método consiste em reações das amostras com nitrito de sódio (NaNO_2), cloreto de alumínio (AlCl_3) e hidróxido de sódio (NaOH), seguidas de leitura de absorbância em espectrofotômetro a 510 nm. A quantificação de flavonoides totais da amostra pode ser realizada por meio de curva padrão preparada com catequina e expressa como equivalentes de catequina.

O método espectrofotométrico denominado “método do DMACA” é utilizado na quantificação de flavanóis totais. Ele consiste na reação do reagente DMACA (*p-Dimethylaminocinnamaldehyde*) com a amostra (Ma et al., 2019). A quantificação pode ser realizada por meio de curva padrão preparada com catequina e expressa como equivalentes de catequina por grama ou mL da amostra.

O método espectrofotométrico propostos por Lamaison e Carnat (1990) e descrito por Quettier-Deleu et al. (2000) e Khadri et al. (2010) possibilita a quantificação de flavonóis através da reação da solução metanólica de cloreto de alumínio e a amostra. E os resultados podem ser obtidos através de curva padrão preparada com rutina e expressos em mg de equivalente rutina por grama ou mL de extrato.

O conteúdo em taninos é determinado de acordo com o método proposto por Broadhurst e Jones (1978) através da reação das amostras com Vanilina-HCl, seguidas de leitura de absorvância em espectrofotômetro (500 nm). A quantificação de taninos da amostra é realizada por meio de curva padrão preparada com catequina. O resultado é expresso em mg de equivalente de catequina por grama ou mL de amostra.

O teor de proantocianidinas totais é determinado de acordo com o método proposto por Maksimović et al. (2005) e Hagerman et al. (2000) através da reação das amostras com Butanol:HCl, seguidas de leitura de absorvância em espectrofotômetro (550 nm). A quantificação de proantocianidinas totais da amostra é realizada por meio de curva padrão preparada com cianidina e expressa como equivalentes de cianidina. O resultado pode ser expresso em mg de equivalente de cianidina por grama ou mL de amostra.

Os métodos cromatográficos são técnicas comumente utilizadas na separação, identificação e quantificação dos compostos presentes em matrizes vegetais e consistem na separação dos analitos contidos na amostra através da eluição na fase móvel e da adsorção na fase estacionária. O tempo de retenção do composto possibilita a separação dos constituintes da amostra, dos analitos e dos interferentes (Zhang et al., 2011; Barros et al., 2011; Douša; Gibala, 2010). Cromatógrafos acoplados com detector de espectrometria de massa são amplamente utilizados devido a sua alta seletividade e sensibilidade (Ben Hassine et al., 2012; Nolvachai; Marriott, 2013).

A cromatografia gasosa é o método empregado na quantificação e identificação dos compostos voláteis, tais como os ácidos graxos. É uma técnica utilizada na pesquisa, desenvolvimento, ou controle de qualidade, em uma grande variedade de áreas devido à sua alta sensibilidade e capacidade de separar e detectar vários compostos simultaneamente. A cromatografia gasosa é uma técnica de separação em que a fase móvel (FM) é um gás e a fase estacionária (FE) pode ser um líquido (cromatografia líquida-gasosa – CLG) ou um sólido (cromatografia sólida-gasosa – CSG). A temperatura e a vazão de gás carreador são os parâmetros operacionais que influenciam neste método.

A separação na CSG ocorre por adsorção, enquanto na CLG é por partição, sendo esta técnica comumente utilizada. O gás utilizado na FM deve ser inerte, pois irá transportar os componentes da amostra através da coluna, sem nenhum tipo de afinidade entre eles. A CSG possui como FE um sólido com grande área superficial e na CLG, a FE é um líquido que fica retido na coluna por um suporte sólido inerte, ou por capilaridade (Cecchi, 2003).

Na literatura são descritos alguns métodos para quantificação e identificação de ácidos fenólicos, isoflavonas, taninos e outros compostos fenólicos em condimentos e especiarias, considerando a polaridade da molécula (Angelo; Jorge, 2006).

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é a técnica comumente utilizada para separação, detecção e identificação de compostos com baixa volatilidade, tais como os fenólicos. Nessa análise um líquido atua como FM enquanto as FE podem ser líquidas ou sólidas. É uma técnica que utiliza alta pressão na separação dos componentes das amostras e assim a análise pode ser feita em poucos minutos. Além disso, possui alta resolução, sensibilidade, reprodutibilidade, maior rapidez e automação. No entanto, O HPLC é um equipamento caro e de alto custo operacional e de manutenção (Cecchi, 2003). Alguns fatores afetam a análise dos compostos fenólicos por HPLC, tais como o tipo de coluna, detectores, fase móvel e as propriedades dos compostos (Cong-Cong et al., 2017). Equipamentos HPLC em fase reversa acoplado com detector ultravioleta (UV) ou um arranjo de diodo (DAD) são amplamente utilizados em análises rotineiras nos laboratórios para identificação e quantificação dos compostos fenólicos em matrizes vegetais. O HPLC acoplado com espectrômetro de massa tem sido utilizada para confirmação da estrutura química em diferentes matérias primas de origem vegetal (Fecka; Turek, 2008; Pang; Malike; Liu; 2009).

PROPRIEDADES BIOLÓGICAS

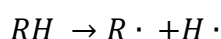
Atividade antioxidante

Os compostos bioativos que apresentam atividade antioxidante são sintetizados pelos animais e vegetais para inibir ou bloquear os processos oxidativos causados pelas Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), tais como ânion superóxido(O_2^-), radical hidroxila (OH), óxido nítrico (NO), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical lipídico (L), protegendo as moléculas de lipídeos, proteínas e carboidratos que são os principais alvos do processo

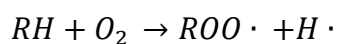
de oxidação. Entre as ERO, o radical hidroxila é mais reativo na indução de lesões nas moléculas celulares e o peróxido de hidrogênio pode passar a membrana nuclear e induzir danos à molécula de DNA (Matkowski, 2008; Reische; Lillard; Eitenmiller, 2008). Assim, os radicais livres são moléculas altamente reativas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados e, por isso, tendem a capturar um elétron para alcançar sua estabilidade. Assim, esses radicais serão reduzidos pela oxidação de outros compostos. Além disso, essas substâncias podem interagir com substratos biológicos, desnaturar as proteínas ou quebrar o DNA, promovendo efeitos graves e irreversíveis para a célula e, conseqüentemente, ao organismo exposto (Souza, 2007).

A oxidação lipídica, denominada também como peroxidação lipídica ou rancificação auto oxidativa, é uma das principais reações de deterioração dos alimentos, pois altera as características sensoriais e nutricionais, ocasiona a perda da qualidade e torna o produto impróprio ao consumo. Nessa reação, o principal substrato são as moléculas dos ácidos graxos insaturados, devido a presença das duplas ligações. Os ácidos graxos insaturados oxidam-se mais rapidamente quando estão livres do que ligados aos triglicerídeos ou fosfolipídios e a quantidade de insaturação também influencia na velocidade da reação (Silva et al., 1999; Ordóñez et al., 2005).

O processo de oxidação lipídica ocorre em três etapas: iniciação, propagação e terminação. Durante a etapa de iniciação são formados os radicais livres a partir dos ácidos graxos insaturados, que se combinam com o oxigênio produzindo peróxidos lipídicos. Nessa primeira fase, o ácido graxo insaturado (RH) doa um próton ao carbono e converte-se em radical livre, conforme a reação abaixo (Ordóñez et al., 2005).

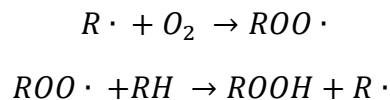


radical aquila

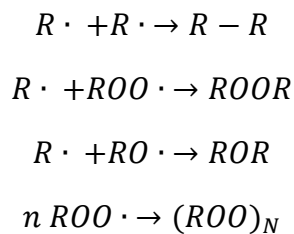


radical peroxi

Na fase de propagação, ocorre a oxidação dos lipídeos insaturados e o acúmulo dos peróxidos. Os radicais livres formados na iniciação se combinam com o oxigênio produzindo mais radicais peróxidos; estes por sua vez poderão subtrair hidrogênio de outra molécula insaturada, produzindo peróxido e um novo radical livre. Esta reação pode ocorrer várias vezes, e sua natureza é de reação em cadeia, conforme a reação abaixo (Silva et al., 1999; Lima; Abdalla, 2001; Ordóñez et al., 2005).



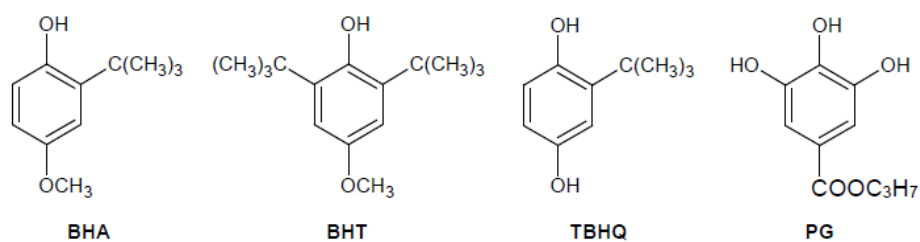
Na propagação, os radicais livres se associam e formam os compostos não radicalares de baixo peso molecular. Essa fase pode ocorrer simultaneamente com a iniciação e a propagação. A partir desse momento, se não houver mais radicais livres para reagir com o oxigênio, o processo de oxidação lipídica finaliza, sendo necessária a produção de nova reação de iniciação para que a oxidação prossiga, conforme a reação abaixo (Silva et al., 1999; Ordóñez et al., 2005).



Para reduzir ou inibir o processo oxidativo nos alimentos podem ser adicionados antioxidantes naturais ou sintéticos que não afetem a cor, sabor e odor; tenham baixo custo; sejam atóxicos; eficazes em baixas concentrações; estáveis e resistentes ao processamento; que não cause efeitos fisiológicos negativos; sejam eficazes em baixas temperaturas; resistentes aos diversos tratamentos; e de fácil obtenção. A escolha do uso de antioxidante depende da compatibilidade com o produto e com as orientações das agências reguladoras (Ordóñez et al., 2005; Reische; Lillard; Eitenmiller, 2008).

Os antioxidantes podem ser classificados em sintéticos e naturais. Os sintéticos apresentam uma estrutura fenólica, que permite a doação de um próton ao radical livre, regenerando assim compostos oxidados e interrompendo o processo de oxidação. A Figura 2 apresenta quatro exemplos de antioxidantes sintéticos (Reische; Lillard; Eitenmiller, 2008).

Figura 2 – Estrutura química de antioxidantes sintéticos: butil-hidroxi-anisol (BHA); butilhidroxi-tolueno (BHT); ter-butirl-hidroquinona (TBHQ); e propil galato (PG)



Fonte: Cavalcante (2011)

Os antioxidantes naturais são encontrados nos organismos vivos, como as enzimas presentes em animais, ou o ácido ascórbico, compostos fenólicos, tocoferóis e carotenóides, sintetizados pelos vegetais (Ramalho; Jorge, 2006; Reische; Lillard; Eitenmiller, 2008). A produção destes compostos depende das condições ambientais e pode ser favorecida ou regulada através das condições adversas, tais como: elevada radiação, temperatura, desequilíbrio mineral ou ataque por agentes patogênicos (Neill et al., 2002; Wilmes et al., 2011).

Medidas da atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos compostos bioativos pode ser determinada através de métodos simples e baratos tais como colorimétricos, biológicos e eletroquímicos, entre outros instrumentais (Borges et al., 2011; Palanisamy et al., 2011). Esses métodos apresentam como princípio a elucidação do mecanismo de ação dos compostos antioxidante que pode ocorrer através da captura dos radicais livres; da doação de átomos de hidrogênio ou elétron; da captura do oxigênio singlete; da inibição de enzimas oxidantes ou quelação de íons metálicos (Pietta, 2000; Paixão et al., 2007; Maqsood; Benjakul, 2010). No entanto, o principal mecanismo de ação estudado consiste na produção e inibição de radicais livres pelos antioxidantes (Ou et al., 2002; Almajano et al., 2008).

As principais características dos métodos são: um substrato adaptado, um iniciador de oxidação (indutor) e uma medida apropriada do ponto final da reação. No entanto, são numerosas as combinações de substratos, indutores e ponto final. Estes métodos podem ser baseados na transferência de elétrons, que medem a habilidade de redução do substrato (antioxidante) ou de átomos de hidrogênio, os quais avaliam a habilidade do substrato em doar hidrogênio (Robards et al., 1999; MacDonald-Wicks; Wood; Garg, 2006).

Assim, diferentes metodologias são utilizadas para determinar a atividade antioxidante de amostras vegetais, como: o *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity* (TEAC), que mede a captura do radical ABTS; a captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil); a habilidade em reduzir o ferro (FRAP - *Ferric Reducing Ability of Plasma*); o TBARS-LDL (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances-Low Density Lipoprotein*); entre outros. Esses métodos são relativamente mais simples e baseiam-se na descoloração da amostra após reação. Os ensaios mais utilizados recebem o nome do reagente cuja absorção será atenuada pelo antioxidante, este reagente indicará a capacidade antioxidante total do produto referente a captura dos radicais livres (Butera et al., 2002).

Método captura do radical DPPH

O método DPPH é amplamente utilizado para avaliar a atividade antioxidante de alimentos, extratos de plantas, óleos essenciais e substâncias puras e consiste na captura radicalar de um elétron ou um átomo de hidrogênio retirado do substrato. Assim, a quantidade do radical DPPH removida do meio é proporcional a atividade “sequestradora” da amostra, sendo possível considerar que a inibição do DPPH é equivalente a atividade antioxidante dos compostos presentes na amostra (Espín; García-Conesa; Tomás-Barberán, 2000). A inibição pode ser comparada ao antioxidante sintético e a perda da cor púrpura para o amarelo é monitorada por espectrofotometria UV-VIS a 515 nm. Através da ação do composto ou de uma espécie radicalar, o DPPH é reduzido formando o difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela e, conseqüentemente, ocorre a redução da absorção (Chandrasekar et al., 2006; Kim; Thomas, 2007; Raymundo, 2004). As Equações 1 e 2 demonstram a reação entre o antioxidante (AH) ou uma espécie radical (R) com o DPPH.



O DPPH é um radical estável, com baixa taxa de deterioração e reatividade com a maioria dos compostos. Deste modo, somente os reagentes redutores considerados fortes são capazes de reagir com estes radicais estáveis de forma estequiométrica (Santos et al., 2007).

A partir dos resultados obtidos pode-se determinar a porcentagem da atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres e/ou a porcentagem de inibição do DPPH no meio reacional. A concentração do composto necessária para inibir a ação do DPPH no meio reacional pode ser determinada a partir da curva de calibração de um composto padrão, por exemplo o Trolox (6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico), e a atividade antioxidante expressa em μMolar de equivalente Trolox. A porcentagem de inibição do radical DPPH pode ser calculada a partir da Equação 3 demonstrada a seguir e corresponde a quantidade de DPPH capturada pela amostra. O IC50, que consiste na quantidade de amostra necessária para reduzir a concentração inicial de DPPH em 50 %, também pode ser determinado. Assim, quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será seu IC50 e maior será a sua atividade antioxidante (SOUSA et al., 2007).

$$\% \text{ inibição} = \frac{A_c - A_t}{A_c} \times 100 \quad (3)$$

Onde: A_c é a absorbância controle ou branco; A_t é a absorbância da amostra

A eficiência do antioxidante é medida a temperatura ambiente, eliminando o risco de degradação térmica das moléculas testadas. Porém, o mecanismo reacional depende da conformação estrutural do antioxidante. Algumas combinações reagem muito rapidamente, porém a maioria das reações são mais lentas e os mecanismos parecem ser mais complexos (Bondet; Brand-Williams; Berset, 1997).

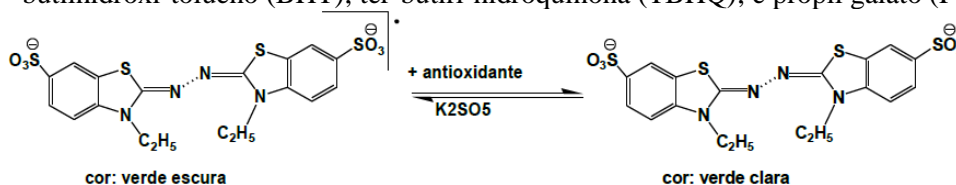
Método da captura do radical ABTS

A captura do radical 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolína-6-ácido-sulfônico (ABTS+) gerado na reação química, eletroquímica ou enzimática pelo composto antioxidante é um dos principais métodos aplicados na determinação da atividade antioxidante de compostos hidrofílicos e lipofílicos. O radical é um composto cromóforo, quimicamente estável e solúvel em água (Kuskoski et al., 2005). Na presença de antioxidantes doadores de hidrogênio, como os compostos fenólicos, pode-se medir a diminuição da formação do radical ABTS+ por espectrofotometria a 734 nm. Neste método, conhecido também como TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*), o radical ABTS+, que apresenta cor verde escura, é formado a partir da oxidação do ABTS por persulfato de potássio, na ausência de luz, por um período 12 a 16 horas e

posteriormente dilui-se o radical em etanol até obter uma absorvância de 0,70 (\pm 0,02) a 734 nm. A energia de ativação é baixa e a reação inicia imediatamente, porém não atinge um máximo de absorvância nas primeiras 6 horas (Henriquez; Aliaga; Lissi, 2002).

Com a adição de um antioxidante no meio reacional, ocorrerá a redução do ABTS⁺ a ABTS promovendo a perda da coloração do meio reacional, cor verde clara (Figura 3). Assim, a atividade antioxidante de compostos puros e extratos vegetais através da captura do radical ABTS⁺ pode ser determinada em função da curva de calibração do Trolox, padrão submetido às mesmas condições de análise do antioxidante (Re et al., 1999).

Figura 3 – Estrutura química de antioxidantes sintéticos: butil-hidroxi-anisol (BHA); butilhidroxi-tolueno (BHT); ter-butiril-hidroquinona (TBHQ); e propil galato (PG)



Fonte: Borges et al. (2011)

O valor TEAC indica a capacidade da amostra de reagir com o radical ABTS⁺ e de inibir os processos oxidativos e depende do tempo de incubação e da concentração do composto antioxidante presente na amostra. A pouca seletividade do ABTS⁺ na reação com átomos doadores de hidrogênio constitui a limitação desse método (Campos; Lissi, 1997). No entanto, a excelente estabilidade do radical no meio reacional permite a obtenção de resultados reprodutíveis, além da obtenção de vários máximos de absorção e uma boa solubilidade (Kuskoski et al., 2005).

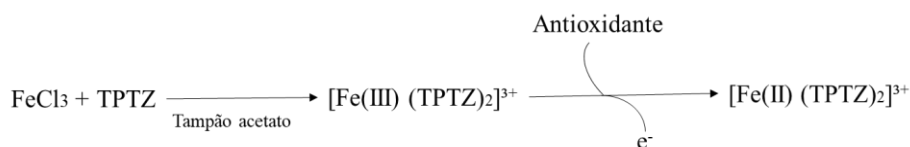
Método de poder de redução do ferro (FRAP)

Os testes de atividade antioxidante citados nos itens anteriores são métodos que medem a capacidade antioxidante da amostra através da inibição dos efeitos oxidativos de espécies reativas proposadamente geradas na mistura reacional através da captura do radical livre. Em contraste a esses métodos, o FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) utiliza antioxidantes como redutores em um método redox, empregando um oxidante facilmente reduzido e presente em excesso estequiométrico. Assim, os compostos antioxidantes presentes na amostra podem ser descritos como redutores, e a inativação de oxidantes por redutores pode ser descrita como reações redox nas quais uma espécie

reativa é reduzida enquanto outra é oxidada. Neste contexto, a atividade antioxidante pode ser referida de forma análoga como potência redutora total (Benzie; Strain, 1999).

Este método consiste na redução do 2,4,6-tripiridil-s-triazina férrico (Fe(III)-TPTZ) em 2,4,6-tripiridil-s-triazina ferroso (Fe(II)-TPTZ) em pH baixo (Figura 4). Esta reação possui uma mudança na coloração, azul claro para azul intenso, que pode ser monitorada por espectrofotometria UV-VIS em 593 nm (Benzie; Strain, 1999; Thaipong et al., 2006). Este método foi inicialmente proposto para estimar a atividade antioxidante total em amostras biológicas e, posteriormente, foi modificado para análise de rotina da atividade antioxidante de substâncias químicas puras e extratos de plantas (Tsai et al., 2002; Niemeyer; Metzler, 2003).

Figura 4 – Reação de produção de Fe²⁺ (forma ferrosa) a partir do complexo formado entre Fe³⁺ (forma férrica) e TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina)



Fonte: Benzie; Strain, 1999

Método de peroxidação lipídica

Em sistemas biológicos, os aldeídos são produzidos quando ocorre quebra dos hidroperóxidos lipídicos. Por isso, é interessante identificar e medir estes compostos como um índice da extensão da peroxidação lipídica para elucidar o papel dos aldeídos como agentes causadores em certas condições patológicas. Métodos analíticos são empregados na determinação qualitativa e quantitativa de aldeídos em sistemas biológicos. O malondialdeído (MDA) é o principal aldeído formado na peroxidação lipídica, e sua determinação e quantificação através do ácido tiobarbitúrico (TBA) é um dos ensaios mais comuns em estudos de peroxidação dos lipídeos (Esterbauer; Cheeseman, 1990).

A determinação da reação entre as espécies reativas originadas da decomposição dos hidroperóxidos com o ácido tiobarbitúrico (TBA) é um método comumente utilizado para os testes in vivo e in vitro. Um dos principais produtos formados no processo oxidativo é o aldeído com três átomos de carbono (MDA). No método de peroxidação lipídica, uma molécula de MDA reage com duas moléculas do TBA produzindo um pigmento com absorção máxima a 532 – 525 nm. Esta reação ocorre em meio ácido (pH

entre 2 e 3), temperatura na faixa de 90 - 100 °C e durante 10 minutos, para aumentar a velocidade e a sensibilidade (Silva et al., 1999; Santos, 2007).

Alguns fatores influenciam os resultados obtidos neste método: preparo do reagente TBA em soluções ácidas fortes, altas concentrações de metais, como o ferro, e altas concentrações de açúcares, como a sacarose. No entanto, o método TBA não é específico para MDA, pois uma variedade de outras substâncias sob condições apropriadas também formam complexos TBA-rosa. Além disso, MDA ou substâncias semelhantes a MDA podem ser produzidas na catálise ácida ou decomposição térmica de precursores, como outros aldeídos, MDA ligados a proteínas, lipídeos oxidados e aminoácidos (Esterbauer; Cheeseman, 1990).

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Agentes antimicrobianos são substâncias químicas de origem natural ou sintética que inibem o crescimento dos microrganismos a nível molecular ou no processo metabólico ou na estrutura celular. Esses compostos podem atuar em bactérias (agentes antibacterianos) ou em fungos (agentes antifúngicos) e são classificados conforme estrutura química ou modo de ação (Taveira et al., 2008). O antimicrobiano deve exibir toxicidade relativa, podendo ser uma função de um receptor específico necessário para ligação do composto ao microrganismo ou inibir os processos bioquímicos essenciais para o microrganismo. No entanto, tais efeitos não devem ser observados no hospedeiro (Mims et al., 1999; Taveira et al., 2008).

A atividade antimicrobiana dos compostos bioativos é influenciada pelo tipo do microrganismo e estrutura da molécula. Em relação a sua estrutura química, o grau de hidroxilação é o principal fator na toxicidade para determinados microrganismos (Campos; Couto; Hogg, 2003; Taguri; Tanaka; Kouto, 2004). Estudos vem sendo desenvolvidos para determinar a atividade antimicrobiana de extratos obtidos de diversas espécies vegetais (Yakoub et al.; 2018; Barbosa et al., 2019; Garcia et al, 2019; Rafińska et al., 2019).

Conforme o mecanismo de ação, os antimicrobianos podem apresentar efeitos microbiostáticos, promovendo bloqueios reversíveis da síntese proteica dos microrganismos e impedindo sua multiplicação; ou microbicida, inibindo a síntese proteica dos microrganismos ou destruindo a membrana citoplasmática, de forma a

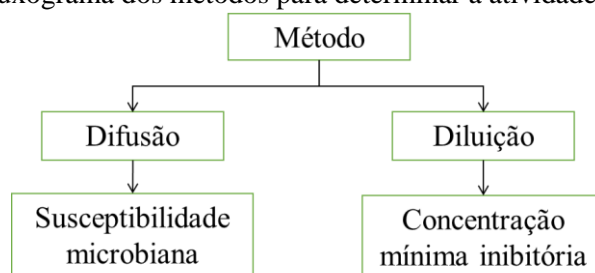
provocar lesões profundas e irreversíveis às suas células (Taveira et al., 2008). Os mecanismos de ação dos antimicrobianos dependem do tipo de microrganismo. Nas bactérias, os compostos antibacterianos inibem a respiração e/ou fosforilação oxidativa, as funções da membrana celular, as sínteses dos ácidos nucleicos e a síntese proteica. Nos fungos, os agentes antifúngicos podem inibir os esteroides da membrana celular; interromper os ciclos celulares como a síntese de DNA, RNA ou proteínas e destruir a parede celular (Souza et al., 2003; Taveira et al., 2008; Schaechter et al., 2002).

A atividade antimicrobiana pode ocorrer em três etapas: [1] as substâncias associam-se aos microrganismos e penetram nas suas células; [2] são transportadas para um sítio ativo intracelular; e [3] ligam-se a sítios bioquímicos específicos, executando suas ações bioquímicas. A resistência microbiana a essas substâncias pode ocorrer em cada uma dessas etapas através da síntese de enzimas que inativam o composto, a prevenção e a modificação do sítio alvo (Schaechter et al., 2002).

Medidas da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana de substâncias puras ou extratos vegetais pode ser determinada através do teste de susceptibilidade por difusão em disco e pela determinação da concentração mínima inibitória (CMI) (Figura 5) (Alves et al., 2008). O pH, a composição do meio, a estabilidade do composto, a concentração do inóculo e a atividade metabólica dos microrganismos são fatores que afetam estes métodos (Brooks; Butel; Morse, 2000).

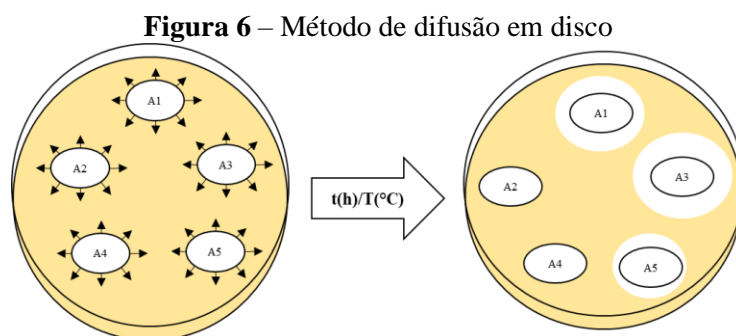
Figura 5 – Fluxograma dos métodos para determinar a atividade antimicrobiana



Fonte: Autores

O teste de difusão em disco é um método qualitativo e consiste na difusão do composto no meio de cultura sólido inoculado com um microrganismo com aparecimento ou não de um halo de inibição (Figura 6). Diferentes tipos de reservatório podem ser utilizados neste método, tais como os discos de papel, cilindros de porcelana ou de aço inoxidável e orifícios feitos no meio de cultura. Dentre estes métodos, o de difusão em

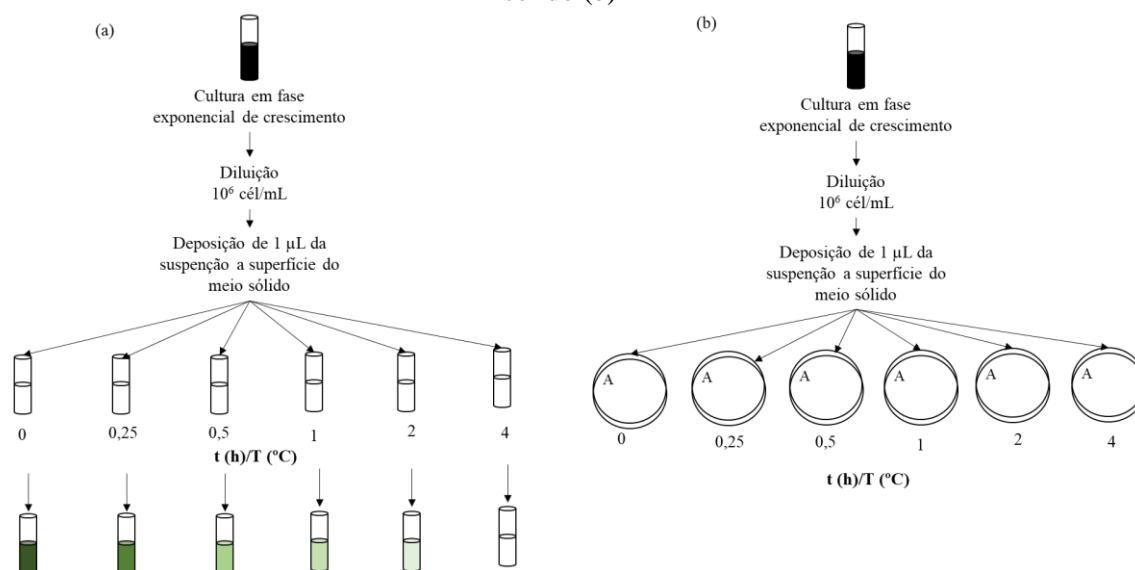
disco de papel é o mais utilizado para extratos vegetais. Neste método, a amostra é colocada em contato com o meio de cultura inoculado com o microrganismo em estudo e, após incubação nas condições de crescimento do microrganismo, os diâmetros dos halos de inibição produzidos são medidos com régua, paquímetro ou leitor de halos (NCCLS, 2006; Vanden Berghe; Vlietinck, 1991).



O teste de difusão em disco permite estabelecer a sensibilidade do microrganismo, no entanto não determina a potência antimicrobiana da amostra. Além disso, limita-se quando as substâncias não se difundem no meio, pois a presença de partículas pode interferir na difusão da amostra (Souza et al., 2003; Vanden Berghe; Vlietinck, 1991). Os microrganismos diferem quanto ao grau de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos e sua sensibilidade pode ser alterada com o tempo da análise (Pelczar Jr; Chan; Ktieg, 1996).

A Concentração Mínima Inibitória (CMI) consiste na menor concentração do composto capaz de inibir o crescimento do microrganismo em tubos ou microplacas nas condições estabelecidas (CLSI, 2009). Nos métodos de diluição, os extratos ou substâncias puras são adicionados ao meio de cultura líquido (Figura 7a) ou sólido (Figura 7b), previamente inoculado com o microrganismo em estudo. Após a incubação, o crescimento microbiano é determinado pela comparação direta ou turbidimétrica da cultura com o controle negativo, meio de cultura inoculado sem a adição do agente antimicrobiano, ou pelo uso de espectrofotômetro em comprimento de onda apropriado (Vanden Berghe; Vlietinck, 1991).

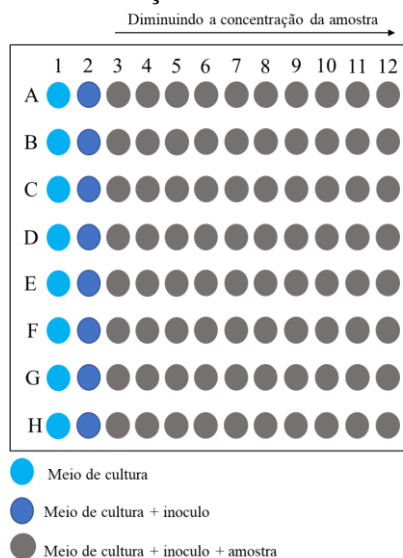
Figura 7 – Determinação da concentração mínima inibitória em meio de cultura líquido (a) ou sólido (b)



Fonte: Autores

O método de diluição em meio líquido pode ser feito em macro (Figura 7a) ou microdiluição (Figura 8) utilizando tubos de ensaio ou microplacas, respectivamente. Entretanto, a microdiluição é mais econômica, por permitir avaliar simultaneamente diversas concentrações da substância antimicrobiana (Alves et al., 2008; Souza et al., 2003).

Figura 8 – Preparo da microplaca do método de microdiluição para determinação da concentração mínima inibitória



Fonte: Autores

CONCLUSÕES

Esta revisão apresentou os principais métodos de identificação e quantificação dos compostos fenólicos obtidos em espécies vegetais, em destaque aos métodos espectrofotométricos e cromatográficos. Os métodos espectrofotométricos são amplamente utilizados por serem considerados métodos simples, rápidos e de baixo custo. No entanto, não permitem a identificação individual dos compostos. Os cromatográficos destacam-se por apresentar alta sensibilidade, seletividade, precisão e exatidão. Para a determinação das atividades antioxidantes e antimicrobianas são aplicados diversos métodos considerando elucidação do mecanismo de ação dos compostos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro da Universidade do Estado do Amapá (UEAP) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amapá (Processo N°: 250.203.133/2018).

REFERÊNCIAS

- ALMAJANO, M. P.; CARBÓ, R.; JIMÉNEZ, A. L.; GORDON, M. Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. **Food Chemistry**, v. 108, p. 55-63, 2008.
- ALVES, E. G.; VINHOLIS, A. H. C.; CASEMIRO, L. A.; FURTADO, N. A. J. C.; SILVA, M. L. A.; CUNHA, W. R.; MARTINS, C. H. G. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**, v. 31, p. 1224-1229, 2008.
- ALU'DATT, M. H.; RABABAH, T.; ALHAMAD, M.N.; AL-MAHASNEH, M. A.; ALMAJWAL, A.; GAMMOH, S.; EREIFEJ, K.; JOHARGY, A.; ALLI, I. A review of phenolic compounds in oil-bearing plants: Distribution, identification and occurrence of phenolic compounds. **Food Chemistry**, v. 218, p. 99-106, 2017.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, p. 1-9, 2007.
- BARBOSA, A. M.; SANTOS, K. S.; BORGES, G. R.; MUNIZ, A. V. C. S.; MENDONÇA, F. M. R.; PINHEIRO, M. S.; FRANCESCHI, E.; DARIVA, C. Separation of antibacterial biocompounds from *Hancornia speciosa* leaves by a sequential process of pressurized liquid extraction. **Separation and Purification Technology**, v. 222, p. 390-395, 2019.
- BARROS, L., DUEÑAS, M., FERREIRA, I. C. F. R., MARIA C. A., SANTOS-BUELGA, C. Use of HPLC-DAD-ESI/MS to profile phenolic compounds in edible wild greens from Portugal. **Food Chemistry**, v. 127, p. 169-173. 2011.

BEN HASSINE, D.; ABDERRABBA, M.; YVON, Y.; LEBRIHI, A.; MATHIEU, F.; COUDERC, F.; BOUJILA, J. Chemical composition and *in vitro* evaluation of the antioxidant and antimicrobial activities of *Eucalyptus gillii* essential oil and extracts. **Molecules**, v. 17, p. 9540-9558, 2012.

BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. **Oxidants And Antioxidants Part A**, [S.L.], p. 15-27, 1999.

BONDET, V. B.; BRAND-WILLIAMS; BERSET. C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. **Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie**, v. 30, p. 609-615, 1997.

BORGES, L. L.; LÚCIO, T. C.; GIL, E. S.; BARBOSA, E. F. Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. **Enciclopédia Biosfera**. v. 7, p. 1-20, 2011.

BROADHURST, R. B.; JONES, W. T. Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 29, p. 788-794, 1978.

BROOKS, G.R.; BUTEL, J.S.; MORSE, A.S. **Microbiologia Médica**. 21. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

BUTERA, D.; TESORIERE, L.; DI GAUDIO, F.; BONGIORNO, A.; ALLEGRA, M.; PINTAUDI, AM.; KOHEN, R.; LIVREA, MA. Antioxidant activities of Sicilian prickly pear (*Opuntia ficus indica*) fruit extracts and reducing properties of its betalains: Betanin and indicaxanthin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 6895-901, 2002.

CAMPOS, F. M.; COUTO, J. A.; HOGG, T. A. Influence of phenolic acids on growth and inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 167-174, 2003.

CAMPOS, A.M.; LISSI, E.A. Kinetics of the reaction between 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) derived radical cations and phenols. **International Journal of Chemical Kinetics**, p. 219-224. 1997.

CAVALCANTE, Marília de Almeida. **Estudo do potencial antimicrobiano e antioxidante de espécies vegetais amazônicas**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Instituto de Tecnologia, Universidade Federal do Pará, Belém, 2011.

CECCHI, E. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. Editora Unicamp. 2ª ed. rev. 2003.

CHANDRASEKAR, D.; MADHUSUDHANA, K.; RAMAKRISHNA, S.; DIWAN, PV. Determination of DPPH free radical scavenging activity by reversed phase HPLC: A sensitive screening method for polyherbal formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 40, p. 460-464. 2006.

CLINICAL and LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically**. M07- A8, v. 29, 8th ed, 2009.

CONG-CONG, X.; BING, W.; YI-QUIONG, P.; JIAN-SHENG, T.; TONG, Z. Advances in extraction and analysis of phenolic compounds from plant materials. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 15, p. 721-731, 2017.

DOUŠA, M., GIBALA, P. Fast HPLC method using ion-pair and hydrophilic interaction liquid chromatography for determination of phenylephrine in pharmaceutical formulations. **Journal of AOAC International**. v. 93, n. 5, p. 436-442. 2010.

ESPÍN, J.C.; GARCÍA-CONESA, M.T.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A. Nutraceuticals: Facts and fiction. *Phytochemistry*, v. 68, p. 648-656, 2000.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K. H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods in enzymology**, v. 186, p. 407-421, 1990.

FECKA, I.; TUREK, S. Determination of polyphenolic compounds in commercial herbal drugs and spices from Lamiaceae: thyme, wild thyme and sweet marjoram by chromatographic techniques. **Food Chemistry**. v. 108, n. 3, p. 1039-1053, 2008.

GARCIA, J. A. A.; CORREA, R. C. G.; BARROS, L.; PEREIRA, C.; ABREU, R. M. V.; ALVES, M. J.; CALHELHA, R. C.; BRACHT, A.; PERALTA, R. M.; FERREIRA, I. C. F. R. Phytochemical profile and biological activities of 'Ora-pro-nobis' leaves (*Pereskia aculeata* Miller), an underexploited superfood from the Brazilian Atlantic Forest. **Food Chemistry**, v. 294, p. 302-308, 2019.

GOGIA, N.; GONGADZE, M.; BUKIA, Z.; ESAIASHVILI, CHKHIKVISHVILI, I. Total polyphenols and antioxidant activity in different species of apples grown in Georgia. **Georgian Med News**, v. 232-233, p. 107-112, 2014.

HAGERMAN, A.; HARVEY-MUELLER, I.; MAKKAR, H. P. S. **Quantification of tannins in tree foliage—a laboratory manual**. FAO/IAEA, Vienna, 2000.

HENRIQUEZ, C.; ALIAGA, C.; LISSI E. Formation and decay of the ABTS derived radical cation: A comparison of different preparation procedures. **International Journal Chemistry Kinetic**, v. 34, p. 659-65, 2002.

HERRMANN, A.P.; WILLEMS, M.; JANKE, H.D. Degradation of natural polyphenols by methanogenic consortia enriched from digested municipal sludge. **Water Research**, v. 35, p. 2575-2582, 2001.

KHADRI, A.; NEFFATI, M.; SMITI, S.; FALÉ, P.; LINO, A. R. L.; SERRALHEIRO, M. L. M.; ARAÚJO, M. E. M. Antioxidant, antiacetylcholinesterase and antimicrobial activities of *Cymbopogon schoenanthus* L. Spreng (lemon grass) from Tunisia. **Lwt - Food Science And Technology**, v. 43, n. 2, p. 331-336, 2010.

KIM, K.W.; THOMAS, R.L. Antioxidative activity of chitosans with varying molecular weight. **Food Chemistry**, v. 101, n. 1, p. 308-313, 2007.

KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A.G.; TRONCOSO, A.M.; MANCINI_FILHO, J.; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.4, p.726-732, 2005.

KREMER, D.; KOSIR, I.J.; KONCIC, M.Z.; CERENAK, A.; POTOČNIK, T; SREČEC, RANDIC, M; KOSALEC, I. Antimicrobial and Antioxidant Properties of *Satureja Montana* L. and *S. Subspicata* Vis. (Lamiaceae). **Curr Drug Targets**, v. 16, p. 1623-1633, 2015.

LAMAISON, J.L., CARNAT, A. Teneurs en acide rosmarinique, en dérivés hydroxycinnamiques totaux et activité antioxydantes chez les Apiacées, les Borraginacées et les Lamiacées médicinales. **Pharmaceutica Acta Helveticae**, v. 65, p. 315–320, 1990.

LIMA, E.S, ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.

MA, S.; KIM, C.; NEILSON, A. P.; GRIFFIN, L. E.; PECK, G. M.; O'KEEFE, S. F.; STEWART, A. C. Comparison of Common Analytical Methods for the Quantification of Total Polyphenols and Flavanols in Fruit Juices and Ciders. **Journal Of Food Science**, v. 84, n. 8, p. 2147-2158, 2019.

MacDONALD-WICKS, L.K.; WOOD, L.G.; GARG, M.L. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, p. 2046-2056, 2006.

MAKSIMOVIĆ, D.; MALEŃIĆ, D.; KOVAČEVIĆ, N. Polyphenol contents and antioxidant activity of *Maydis stigma* extracts. **Bioresource Technology**. v. 96, 873–877, 2005.

MAQSOOD, S.; BENJAKUL, S. Comparative studies of four different phenolic compounds on in vitro antioxidative activity and the preventive effect on lipid oxidation of fish oil emulsion and fish mince. **Food Chemistry**, v. 119, p. 123-132, 2010.

MATKOWSKI, A. Plant in vitro culture for the production of antioxidants - A review. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 548-560, 2008.

MIMS, C.; PLAYFAIR, J.; ROITT, I.; WAKELIN, D.; WILLIAMS, R. **Microbiologia médica**. 2 ed. São Paulo: Manole, 1999.

NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**. 19^o Ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, 26(1), USA, 2006.

NEILL, S.O., GOULD, K.S., KILMARTIN, P.A., MITCHELL, K.A., MARKHAM, K.R., Antioxidant activities of red versus green leaves in *Elatostema rugosum*. **Plant Cell and Environment**. v. 25, p. 539-47. 2002.

NIEMEYER, H.B.; METZLER, M. Differences in the antioxidant activity of plant and mammalian lignans. **Journal of Food Engineering**. v. 56, p. 255–256, 2003.

NOLVACHAI, Y.; MARRIOTT, P.J. GC for flavonoids analysis: Past, current, and prospective trends. **Journal of Separation Science**, v. 36, p. 20-36, 2013.b

ORDÓÑEZ, J.A.; RODRÍGUEZ, M.I.C.; ÁLVAREZ, F.L.; SANZ, M.L.G.; MINGUILLÓN, G.D.G, de F.; PERALES, L. de L.H.; CORTECERO, M.D.S. **Tecnologia de Alimentos: Componentes dos Alimentos e Processos**. Editora Artmed, v. 1. p. 43-44, 2005.

OU, B.; HUANG, D.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J.A.; DEEMER, E.K. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 3122-3128, 2002.

PALANISAMY, U.D., LING, L.T., MANAHARAN, T., Appleton, D. Rapid isolation of geraniin from *Nephelium lappaceum* rind waste and its anti-hyperglycemic activity. **Food Chemistry**, v. 127, p. 21-27, 2011.

PAIXÃO, N.; PERESTRELO, R.; MARQUES, J. C.; CÂMARA, J. S.; Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rose´ and white wines. **Food Chemistry**, v. 105, p. 204-214, 2007.

PANG, N.; MALIKE, D.; LIU, H. Simultaneous determination of main bioactive components in *Rosa multiflora* Thunb. and their fragmentation study by LC–MS. **Chromatographia**, v. 70, p. 1253, 2009.

PELCZAR Jr, M.J.; CHAN, E.C.S., KTIEG, N.R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2. Ed. São Paulo: Makron Books do Brasil, 1996.

PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035- 1042, 2000.

POURABOLI, I., NAZARI, S.; SABET, N.; SHARIFIFAR, F.; JAFARI, M. Antidiabetic, antioxidant, and antilipid peroxidative activities of *Dracocephalum polychaetum* shoot extract in streptozotocin-induced diabetic rats: *In vivo* and *in vitro* studies. **Pharm Biol**, v. 54, p. 272-278, 2016.

QUETTIER-DELEU, C.; GRESSIER, B.; VASSEUR, J.; DINE, T.; BRUNET, C.; LUYCKX, M.; CAZIN, M.; CAZIN, J.; BAILLEUL, F.; TROTIN, F. Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, p. 35-42, 2000.

RAMALHO, V.C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 26, p.755-760, 2006.

RAFIŃSKA, K.; POMASTOWSKIB, P.; RUDNICKAA, J.; KRAKOWSKAA, A.; MARUŚKAC, A.; NARKUTEC, M.; BUSZEWSKIA, B. Effect of solvent and extraction technique on composition and biological activity of *Lepidium sativum* extracts. **Food Chemistry**, v. 289, p. 16–25, 2019.

RAYMUNDO, MS, HORTA, P, FETT. R, Atividade antioxidante in vitro de extratos de algumas algas verdes (Chlorophyta) do litoral catarinense (Brasil). **Revista Brasileira de Ciências Farmacológicas**, v. 40, 2004.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

REISCHE, D.W.; LILLARD, D.A.; EITENMILLER, R.R. Antioxidants. In: AKOH, C.C.; MIN, D.B. **Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology**. 3ª Ed. Boca Raton, FL – USA: CRC Press. p. 409-430, 2008.

ROBARDS, K.; PRENZLER, P.D.; TICKET, G.; SWATSITANG, P.; GLOVER, W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruit. **Food Chemistry**, v. 66, p. 401-436, 1999.

RON, B.H.; WILLS, K.B.; MORGAN, M. Herbal products: active constituents, modes of action and quality control. **Nutrition Research Reviews**, v. 36, p. 65-71, 2000.

SANTOS, M.H.; BATISTA, B.L.; DUARTE, S.M.S.; ABREU, C.M.P.; GOUVEA, C.M.C.P. Influência do processamento e da torrefação sobre a atividade antioxidante do café (*Coffea arabica*). **Química Nova**, v. 30, p. 604-610, 2007

SCHAECHTER, M.; ENGLEBERG, N.C.; EISENSTEIN, B.I.; MEDOFF, G. **Microbiologia: Mecanismos das Doenças Infecciosas**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

SIMÕES, C.M.O.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G.; DE MELLO, J.C.P.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2000.

SILVA, F.A.M.; BORGES, M.F.M.; FERREIRA, M.A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 22, p. 94-103, 1999.

SOUSA, C.M. de M.; SILVA, H.R.; VIEIRA JR, G.M.; AYRES, M.C.C.; DA COSTA, C.L.S.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAÚJO, P.B. de M.; BRANDÃO, M.S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, p. 351-355, 2007.

SOUZA, J.N.S. **Etude des propriétés antioxydantes in vitro d'extraits de feuilles de *Byrsonima crassifolia* et *Inga edulis* et caractérisation partille dès composés**

phénoliques. Tese (Doutorado em Ciências Agronômicas e Engenharia Biológica) – Faculte d'ingénierie biologique, agronomique et environnementale, Université catholique de Louvain – Belgique, 2007.

SOUZA, M.M.; BELLA CRUZ, A.; SCHUMACHER, M.B.; KREUGER, M.R.O.; FREITAS, R.A.; BELLA CRUZ, R.C. **Métodos de avaliação de atividade biológica de produtos naturais e sintéticos. Ciências Farmacêuticas:** Contribuição ao Desenvolvimento de Novos Fármacos e Medicamentos. Itajaí: Editora da UNIVALI, 2003.

TAGURI, T.; TANAKA, T.; KOUNO, I. Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, p. 1965-1969, 2004.

TAVEIRA, N.; OLIVEIRA, A.; GOMES, O.; NASCIMENTO, T. **Manual Prático de Microbiologia.** Instituto Superior de Ciências da Saúde. 2008.

THAIPONG, K.; BOONPRAKOB, U.; CROSBY, K.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; BYRNE, D.H. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 6-7, p. 669-675, 2006.

TSAI, P. J.; McINTOSH, J.; PEARCE, P.; CAMDEN, B.; JORDAN, B. R. Anthocyanin and antioxidant capacity in Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract. **Food Research International**, v. 35, p. 351–356, 2002.

VANDEN BERGHE, D.A.; VIENTINK, A.J. Screening methods of antibacterial and antiviral agents from higher plants. In: HOSTETTMANN, K. **Methods in plant biochemistry, assays for bioactivity.** London: Academic Press, 1991.

WILMES, A.; CREAN, D.; AYDIN, S.; PFALLER, W.; JENNINGS, P.; LEONARD, M.O. Identification and dissection of the Nrf2 mediated oxidative stress pathway in human renal proximal tubule toxicity. **Toxicology in Vitro**. v. 25, p. 613-622. 2011.

YAKOUB, A.R.B.; ABDEHEDI, O.; JRIDI, M.; ELFALLEH, W.; NASRI, M. Flavonoids, phenols, antioxidant, and antimicrobial activities in various extracts from Tossa jute leave (*Corchorus olitorus* L.). **Industrial Crops & Products**, v. 118, p. 206-213, 2018.

ZHANG, C.P.; ZHENG, H.Q.; LIU, G.; HU, F.L. Development and validation of HPLC method for determination of salicin in poplar buds: Application for screening of counterfeit propolis. **Food Chemistry**, v. 127, p. 345-350, 2011.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v. 64, p. 555-559, 1999.

ZOU, Y.; LU, Y.; WEI, D. Antioxidant activity of flavonoid-rich extract of *Hypericum perforatum* L in vitro. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 52, p. 5032-5039, 2004.