



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

PAULA CORREIA MEDEIROS DOS SANTOS

PROPRIEDADES ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANA E TOXICIDADE DO
EXTRATO DA CASCA DO ALHO (*Allium sativum L.*)

FORTALEZA

2022

PAULA CORREIA MEDEIROS DOS SANTOS

PROPRIEDADES ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANA E TOXICIDADE DO
EXTRATO DA CASCA DO ALHO (*Allium sativum L.*)

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Área de concentração: Microbiologia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Evânia Altina
Teixeira de Figueiredo

Coorientadora: Profa. Dra. Larissa Moraes
Ribeiro da Silva

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S237p Santos, Paula Correia Medeiros dos.
Propriedades antioxidante, antimicrobiana e toxicidade do extrato da casca do alho (*Allium sativum* L.)
/ Paula Correia Medeiros dos Santos. – 2022.
61 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Fortaleza, 2022.
Orientação: Profa. Dra. Evânia Altina Teixeira de Figueiredo.

1. Casca do alho (*Allium sativum* L.). 2. Atividade antimicrobiana. 3. Extratos vegetais. I. Título.
CDD 664

PAULA CORREIA MEDEIROS DOS SANTOS

PROPRIEDADES ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANA E TOXICIDADE DO EXTRATO DA
CASCA DO ALHO (*Allium sativum L.*)

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Área de concentração: Microbiologia de Alimentos.

Aprovada em: 09/05/2022.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Evânia Altina Teixeira de Figueiredo (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Larissa Morais Ribeiro da Silva (Coorientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr Francisco Ernani Alves Magalhaes
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Dra. Giovana Matias do Prado
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Cristiane Pereira de Lima
Instituto Federal de Educação Tecnológica do Ceará - IFCE

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelas graças concedidas e por me prover força e coragem para conquistar meus sonhos.

Aos animais, especialmente Mel, Molly, Nina, Kayla, Ohana, Zoey, Lola, Ninho, Cacau, Kate, Toby e Will, por serem a minha paixão, inspiração e motivação diária. Tudo sempre foi e será por vocês e para vocês.

Aos meus pais Paulo Roberto e Maria Vitória, minha irmã Pâmela Vitória e a toda a minha família por todo amor e carinho, por estarem sempre presentes e me apoiarem em tudo.

Ao amor da minha vida, Fábio por acreditar em mim sempre, mesmo quando eu não acreditava, por me incentivar a buscar novas conquistas e me acolher em todas as dificuldades. Obrigada por me ajudar a enxergar o potencial que há em mim.

À psiquiatra Ana Livia e psicóloga Beverly, por me acolherem e auxiliarem no meu desenvolvimento emocional, essencial para superar os obstáculos e concluir este mestrado.

À Universidade Federal do Ceará e, principalmente ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela oportunidade de obtenção de conhecimento, por toda a assistência necessária e também pelo conhecimento adquirido.

À CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

À Profa. Dra. Evânia Altina Teixeira de Figueiredo, pela oportunidade de ingressar na área de microbiologia, pela qual me apaixonei. Por abrir as portas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos para que eu pudesse aprender e executar os experimentos e também por toda a orientação e ensinamentos.

À Profa. Dra. Larissa Moraes Ribeiro da Silva, por toda orientação, auxílio, atenção e motivação, imprescindíveis para a execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Francisco Ernani Alves Magalhaes, por toda a ajuda na execução, estatística e análise dos dados sobre os testes toxicológicos dos peixes-zebra.

Às professoras participantes da banca examinadora Dra Giovana e Dra Cristiane pelo tempo dedicado e pelas valiosas e sugestões e colaborações.

À Neuma, técnica do Laboratório de Microbiologia de Alimentos (didático) e aos estagiários Fernando, Giulianna e Jéssica por toda ajuda durante a execução das análises.

Aos técnicos do Laboratório de Análise e Processamento de Frutos e Hortaliças da

UFC, Fernando e Liana, por toda a dedicação, ajuda e ensinamentos durante as análises. À dona Francisca, auxiliar de serviços gerais, pela gentileza, companhia e auxílio.

À empresa Alimempro pela parceria e disponibilidade em ceder as cascas de alho utilizadas neste trabalho.

Aos amigos da turma de mestrado, principalmente Ana Karoline, Augusto, Clarissa, Elvino, Gecyene e Gilleno pela companhia, conversas, ajuda e sugestões recebidas.

“O período de maior ganho em conhecimento e experiência é o período mais difícil da vida de alguém.” (Dalai Lama).

RESUMO

O alho (*Allium sativum* L.) é uma especiaria cultivada desde a antiguidade, bastante utilizado tanto como alimento, como por seus efeitos medicinais. Apesar de ser muito consumido, grande parte das pesquisas sobre *A. sativum* se limitam ao estudo do bulbo e seus bulbilhos, ainda que a casca do alho corresponda a 25% do total da produção e seja geralmente descartada pela indústria. Com a finalidade de obter uma utilização a este subproduto o objetivo deste trabalho foi elaborar extratos vegetais a partir da casca do alho (*Allium sativum* L.), utilizando maceração e turbolização como métodos de extração e água ou soluções hidroalcoólicas (50% e 70%) como solventes, avaliar os extratos obtidos em relação ao conteúdo de compostos bioativos, ao potencial antimicrobiano, capacidade antioxidante e toxicidade. Como resultados os extratos da casca do alho obtiveram altos teores de compostos fenólicos, de taninos totais, de flavonoides e antocianinas. As soluções hidroalcoólicas demonstraram-se mais eficientes na extração destes compostos em relação à utilização de solventes aquosos, assim como o método de maceração foi significativamente superior ao método de turbolização. Esta mesma correlação foi obtida na avaliação do potencial antioxidante, tanto pela captura do radical ABTS, como pelo DPPH. Apenas os extratos hidroalcoólicos apresentaram efeito antimicrobiano frente aos microorganismos gram positivos *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*, demonstrando efeitos bactericidas, mesmo em baixas concentrações (a partir de 3mg/mL). No entanto, ainda que nenhum dos extratos tenha demonstrado toxicidade aguda, tanto em relação ao microcrustáceo *Artemia salina* como zebrafish (*Danio rerio*) adulto, no teste de campo aberto os animais tratados com extratos hidroalcoólicos (70%) tiveram sua motilidade diminuída. Dessa forma podemos concluir que os extratos ETH50% e EMH50% foram os mais promissores, pois apresentaram alto índice de compostos bioativos, atividade antioxidante e antimicrobiana, aliada à baixa toxicidade, demonstrando excelente potencial para futuras aplicações em matrizes alimentares.

Palavras-chave: casca do alho (*Allium sativum* L.); atividade antimicrobiana; extratos vegetais.

ABSTRACT

Garlic (*Allium sativum L.*) is a spice cultivated since antiquity, widely used both as food and for its medicinal effects. Despite being heavily consumed, much of the research on *A. sativum* is limited to the study of the bulb and its bulbils, even though the garlic peel corresponds to 25% of the total production and is generally discarded by the industry. In order to obtain a use of this by-product the objective of this work was to elaborate vegetable extracts from the peel of garlic (*Allium sativum L.*) using maceration and turbolization as extraction methods and water or hydroalcoholic solutions (50% and 70%) as solvents and to evaluate the extracts obtained in relation to the content of bioactive compounds, antimicrobial potential, antioxidant capacity and its toxicity. As a result, garlic peel extracts obtained high levels of phenolic compounds, total tannins, flavonoids and anthocyanins. The hydroalcoholic solutions proved to be more efficient in the extraction of these compounds in relation to the use of aqueous solvents, as well as the maceration method was significantly superior to the turbolization method. This same correlation was obtained in the evaluation of the antioxidant potential, both by ABTS radical capture and by DPPH. Only the hydroalcoholic extracts showed an antimicrobial effect against the gram positive microorganisms *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*, demonstrating bactericidal effects, even at low concentrations (from 3mg/mL). However, although none of the extracts showed acute toxicity, both in relation to the microcrustacean *Artemia salina* and adult zebrafish (*Danio rerio*), in the open field test the animals treated with hydroalcoholic extracts (70%) had their motility reduced. Thus, we can conclude that the ETH50% and EMH50% were the most promising extracts, as they presented a high index of bioactive compounds, antioxidant and antimicrobial activity, combined with low toxicity, demonstrating excellent potential for future applications in food matrices.

Keywords: garlic (*Allium sativum L.*) peel; antimicrobial activity; plant extracts.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | | |
|-------------|--|----|
| Figura 1 – | Esquema demonstrando as partes que compõe o bulbo do alho..... | 12 |
| Figura 2 – | Transformação de alliina em alicina através da enzima alinase..... | 13 |
| Figura 3 – | Fluxograma das etapas da metodologia do projeto..... | 19 |
| Figura 4 – | Fluxograma do descasque mecânico dos bulbos de alho..... | 20 |
| Figura 5 – | Fluxograma do preparo das cascas de alho..... | 21 |
| Fórmula 1 – | Cálculo do rendimento dos extratos em %..... | 22 |
| Fórmula 2 – | Cálculo do teor de taninos totais em (mg/100mL)..... | 24 |
| Figura 6 – | Efeito dos extratos hidroalcoólicos da casca de <i>Allium sativum</i> L. EMH50% (A), ETH50% (B), EMH70% (C) e ETH70% (D) na motilidade de peixes- zebra adultos, expresso através do número de cruzamento de linhas..... | 43 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|------------|--|----|
| Tabela 1 – | Rendimento de extratos obtidos da casca de <i>Allium sativum</i> L..... | 31 |
| Tabela 2 – | Teor de compostos bioativos de extratos obtidos da casca de <i>Allium sativum</i> L. | 32 |
| Tabela 3 – | Potencial antioxidante de extratos obtidos da casca de <i>Allium sativum</i> L... | 36 |
| Tabela 4 – | Atividade antimicrobiana de extratos da casca de <i>Allium sativum</i> L. testados por difusão em ágar..... | 38 |
| Tabela 5 – | Atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos da casca de <i>Allium sativum</i> L..... | 40 |

SUMÁRIO

| | | |
|---------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 6 |
| 2 | OBJETIVOS | 8 |
| 2.1 | Objetivo geral..... | 8 |
| 2.2 | Objetivos específicos..... | 8 |
| 3 | JUSTIFICATIVA TEÓRICA | 9 |
| 3.1 | Extratos Vegetais e sua aplicação como antimicrobiano natural..... | 9 |
| 3.2 | Alho (<i>Allium sativum L.</i>)..... | 11 |
| 3.3 | Métodos de extração de compostos bioativos..... | 14 |
| 3.4 | Bactérias causadoras de surtos alimentares..... | 16 |
| 3.4.1 | <i>Staphylococcus aureus</i> | 16 |
| 3.4.2 | <i>Listeria monocytogenes</i> | 17 |
| 3.5 | Avaliação da toxicidade em extratos vegetais..... | 17 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODOS | 19 |
| 4.1 | Obtenção das cascas de alho..... | 19 |
| 4.2 | Preparo das cascas do alho..... | 20 |
| 4.3 | Preparação dos extratos..... | 21 |
| 4.4 | Caracterização dos extratos vegetais..... | 22 |
| 4.4.1 | <i>Rendimento dos extratos</i> | 22 |
| 4.4.2 | <i>Determinação de compostos bioativos</i> | 23 |
| 4.4.2.1 | <i>Quantificação de polifenóis totais</i> | 23 |
| 4.4.2.2 | <i>Quantificação de antocianinas totais e Flavonóides amarelos</i> | 23 |
| 4.4.3 | <i>Determinação do potencial antioxidante total</i> | 24 |
| 4.4.3.1 | <i>Método da captura do radical sal de amônio do ácido 2,2 azinobis (3-etilbenzeno-6- sulfônico) (ABTS+)</i> | 24 |
| 4.4.3.2 | <i>Ensaio do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)</i> | 25 |
| 4.5 | Atividade antimicrobiana | 25 |
| 4.5.1 | <i>Preparo do inóculo</i> | 25 |
| 4.5.1.1 | <i>Teste de difusão em Ágar</i> | 25 |
| 4.5.2 | <i>Atividade antimicrobiana por microdiluição</i> | 26 |

| | | |
|---------|---|----|
| 4.5.2.1 | Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)..... | 27 |
| 4.5.2.2 | Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)..... | 27 |
| 4.6 | Avaliação da toxicidade dos extratos aquoso e hidroalcoólicos da casca do alho.. | 28 |
| 4.6.1 | Toxicidade <i>in vitro</i> | 28 |
| 4.6.2 | Toxicidade <i>in vivo</i> | 28 |
| 4.7 | Análises estatísticas..... | 29 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 31 |
| 5.1 | Rendimento dos extratos..... | 31 |
| 5.2 | Teor de compostos bioativos em extratos da casca de <i>Allium sativum L.</i> | 32 |
| 5.2.1 | Teor de taninos totais em extratos da casca do alho (<i>Allium sativum L.</i>)..... | 34 |
| 5.2.2 | Quantificação de antocianinas e flavonoides..... | 35 |
| 5.3 | Avaliação do potencial antioxidante..... | 36 |
| 5.4 | Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos da casca de <i>Allium sativum L.</i> | 38 |
| 5.4.1 | Teste de difusão em ágar..... | 38 |
| 5.4.2 | Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)..... | 40 |
| 5.5 | Avaliação da toxicidade dos extratos da casca de <i>Allium sativum L.</i> | 41 |
| 5.5.1 | Teste de toxicidade sobre <i>Artemia salina</i> | 41 |
| 5.5.2 | Avaliação da toxicidade sobre <i>Danio rerio</i> | 42 |
| 6 | CONCLUSÃO..... | 45 |
| | REFERÊNCIAS..... | 46 |

1 INTRODUÇÃO

Estudos envolvendo substâncias antimicrobianas naturais, visando a sua utilização na conservação de alimentos, tem recebido grande atenção das indústrias alimentícias, devido à crescente resistência microbiana a conservantes convencionais e à preocupação dos consumidores quanto à segurança no uso de aditivos sintéticos, o que leva a uma demanda por aditivos naturais (TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010; GYAWALI; IBRAHIM, 2014).

Existe um número grande de espécies vegetais que são consideradas medicinais, porém é essencial que estas espécies sejam avaliadas, tanto com relação à sua eficácia, como sua toxicidade, para que possam ser utilizadas com segurança pela população (OLIVEIRA *et al.*, 2018). Dentre tantas espécies vegetais, o alho (*Allium sativum* L.) é uma especiaria que é cultivada desde a antiguidade, sendo produzido inicialmente na Ásia Central e se difundido mundialmente, bastante utilizado como alimento ou remédio (LEONÊZ, 2008; FRATIANNI *et al.*, 2016).

Apesar do alho ser muito consumido, grande parte das pesquisas sobre *A. sativum* se limitam ao estudo do bulbo e seus bulbilhos, ainda que a casca do alho corresponda a 25% do total da produção (KIM *et al.*, 2009).

A indústria de alimentos produz uma série de coprodutos com alto potencial de utilização e o aproveitamento destes produtos minimiza o impacto ambiental causado pelas indústrias e ainda se agrega valor a estes subprodutos, sendo a sua utilização um interesse econômico, científico e tecnológico (FERRARI *et al.*, 2004).

A casca do alho, obtida industrialmente, normalmente é descartada, caracterizando-se como um subproduto da produção e sendo utilizada apenas como biossorvente em algumas áreas da indústria química (HAMEED; AHMAD, 2009; KAI *et al.*, 2011; CHOWDHURY *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2014; SELVAMANI *et al.*, 2016).

O extrato da casca de alho contém compostos fenólicos, assim como o bulbo, que lhe conferem propriedades antioxidantes e antibacterianas (ICHIKAWA *et al.*, 2003; KALLEL *et al.*, 2014), no entanto a análise do potencial antioxidante e antibacteriano de extratos obtidos a partir da casca do alho por diferentes métodos ainda não está bem elucidado.

Deste modo, a avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de extratos

obtidos a partir da casca do alho, além de conferir uma alternativa de utilização para um coproduto industrial de valor agregado, evita o desperdício e ainda possibilita a sua utilização como um aditivo natural em alimentos, evitando a utilização de conservantes sintéticos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os extratos vegetais obtidos a partir da casca do alho (*Allium sativum L.*) em relação ao conteúdo de compostos bioativos, ao potencial antimicrobiano, a capacidade antioxidante e sua toxicidade

2.2 Objetivos específicos

Obter extratos aquosos e hidroalcólicos da casca do alho;

Caracterizar os extratos obtidos quanto ao rendimento de extração, ao conteúdo de compostos fenólicos totais e determinar especificamente o teor de taninos, flavonoides e antocianinas;

Avaliar o potencial antioxidante de extratos obtidos da casca do alho (*Allium sativum L.*)

Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos da casca do alho (*Allium sativum L.*) frente à *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*;

Avaliar a toxicidade dos extratos obtidos frente à Zebrafish (*Danio rerio*) adulto e o microcrustáceo *Artemia salina*;

3 JUSTIFICATIVA TEÓRICA

3.1 Extratos Vegetais e sua aplicação como antimicrobiano natural

Devido ao seu metabolismo secundário, os vegetais são capazes de produzir substâncias com propriedades antimicrobianas. Por isso, extratos vegetais têm potencial para sua utilização pela indústria alimentícia como antimicrobianos naturais, com o intuito de melhorar a segurança e a qualidade dos produtos (TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010; GYAWALI; IBRAHIM, 2014).

Os principais compostos extraídos das plantas responsáveis pelas propriedades antimicrobianas incluem os compostos fenólicos como: fenóis simples, ácidos fenólicos, quinonas, flavonas, flavonóis, flavonoides, taninos e cumarinas, além dos óleos essenciais, alcaloides e terpenóides (GYAWALI; IBRAHIM, 2014; SOUZA *et al.*, 2017). A presença destes compostos nos extratos de origem vegetal varia de acordo com a parte da planta utilizada na elaboração do extrato, que pode ser obtido a partir da raiz, caule, folha, flor, fruto, semente e casca. Além disso, o método de extração e o solvente utilizado também influenciam na composição final do extrato (CABRAL *et al.*, 2013; CALO *et al.*, 2015), sendo necessários estudos que abordem a influência da escolha desses parâmetros para maior aproveitamento e extração dos compostos.

A variedade dos compostos extraídos e o sinergismo entre estes podem aprimorar as propriedades bioativas do extrato, pois diferentes modos de ação dificultam a resistência microbiana (CABRAL *et al.*, 2013). Os compostos fenólicos, por exemplo, possuem grupamentos hidroxilas (-OH) que são capazes de afetar a funcionalidade da membrana celular através da interação com as proteínas membranares, podendo modificar a estrutura e função intracelular destas proteínas, danificando diversas funções celulares importantes, como o transporte de elétrons, síntese de ácidos nucleicos e proteínas, absorção de nutrientes e atividade enzimática (GYAWALI; IBRAHIM, 2014; PISOSCHI *et al.*, 2018).

De acordo com Li *et al.* (2006), os compostos fenólicos são os constituintes químicos predominantes no reino vegetal e que apresentam maior amplitude de estruturas químicas, variando de moléculas simples, tais como os ácidos fenólicos, a compostos complexos, tais como taninos. Os diferentes grupos dos fenólicos compreendem os fenóis simples, os ácidos fenólicos, flavonóides, biflavonóides, antocianidinas, cumarinas e antraquinonas (ROBARDS *et al.*, 1997; WOLLENWEBER *et al.*, 1993).

Os compostos fenólicos sintetizados pelas plantas em resposta a infecções microbianas podem atuar como agentes antimicrobianos naturais (SILVER; BOSTIAN, 1990). A presença destes pode ser importante na indústria alimentar para aumentar o prazo de validade dos alimentos e o mecanismo de ação destes antimicrobianos naturais deve-se a ação direta na membrana ou na parede celular dos microrganismos (COWAN, 1999). Por outro lado, a eficácia dos compostos fenólicos na inibição do crescimento de bactérias (Gram-positivas e Gram-negativas) e bolores foi comprovada pela realização de ensaios microbianos (TIAN *et al.*, 2009). Dessa forma, acredita-se que quanto maior o teor de compostos fenólicos presentes em uma matriz vegetal ou extrato, maior possibilidade de efeito antimicrobiano.

Taninos são metabólitos secundários do metabolismo dos vegetais que fazem parte do grupo de compostos fenólicos e normalmente estão presentes em maior quantidade na parte externa das plantas. Estas substâncias apresentam atividade antimicrobiana, anticarcinogênica, anti-inflamatória e cicatrizante (ANSARY *et al.*, 2020).

Os flavonoides compõem a maior classe de compostos fenólicos presentes nos vegetais e desempenham diversas funções nas plantas, como a pigmentação e a defesa. São compostos que apresentam atividade antioxidante, atuando através da reação das hidroxilas com os radicais livres e também como pigmentos naturais (BOBBIO & BOBBIO, 1995).

Pertencentes ao grupo dos flavonóides, as antocianinas são glicosídeos responsáveis pela pigmentação de diferentes espécies vegetais, podendo variar entre as cores vermelha, roxa e azul observadas nas plantas. São compostos instáveis que sofrem degradação por ação de enzimas e do oxigênio e pela variação de pH, sendo consideradas excelentes antioxidantes pela sua capacidade de doação de elétrons aos radicais livres (DE ASSUNÇÃO ARAÚJO PEREIRA *et al.*, 2012).

Estudos recentes têm comprovado o potencial antimicrobiano destes extratos inclusive contra microrganismos patogênicos de importância em alimentos. Ferreira (2017) avaliou a atividade antimicrobiana de extratos aquosos oriundos de diferentes espécies e estruturas vegetais (folha e casca do caule de Aroeira, folha de Quixabá, casca do caule do Cumaru, semente de Sucupira Branca e casca do caule de Marmeleiro Preto e Sabiá) frente às bactérias Gram positivas (*L. monocytogene* e *S. aureus*,) e Gram negativas (*E. coli*, *S. Enteridis* e *P. aeruginosa*), e verificou que os extratos da folha da Aroeira e da casca do caule do Marmeleiro Preto apresentaram ação contra todos os microrganismos estudados. Extratos aquosos e hidroalcolicos da folha de cumaru também apresentaram ação antimicrobiana, tanto em Gram positivas, como Gram negativas (LIMA, 2018).

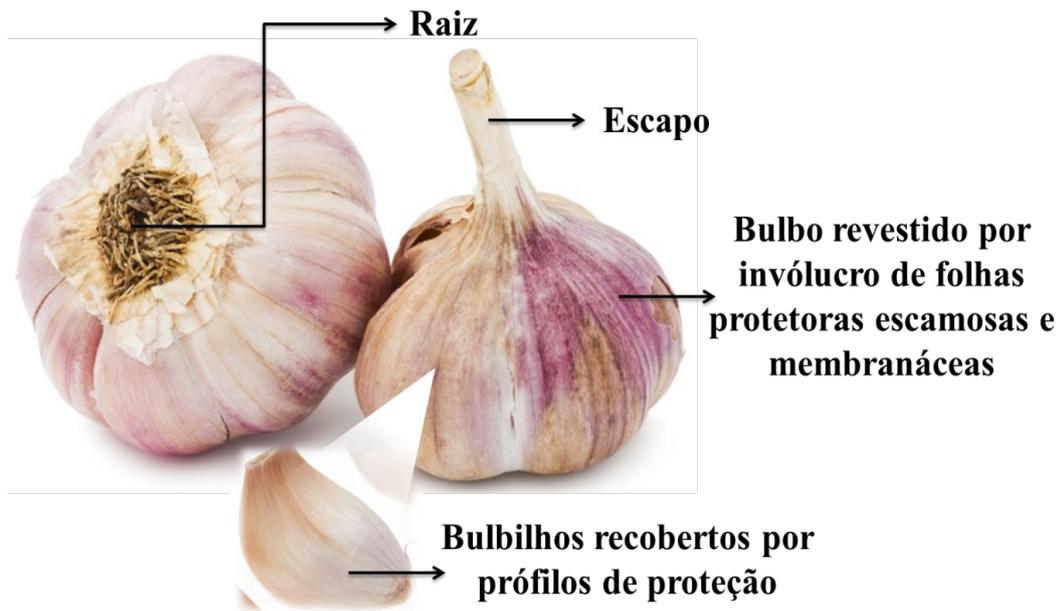
3.2 Alho (*Allium sativum* L.)

O alho (*Allium sativum* L.) é uma planta herbácea da família *Liliaceae*, sendo encontrado na forma de raiz. Seu bulbo, vulgarmente conhecido como cabeça, é constituído por vários bulbilhos comumente denominados de “dentes” (figura 1). É uma espécie vegetal de origem asiática, não endêmica no Brasil, porém é produzida e consumida mundialmente (KALLEL; CHAABOUNI, 2017; EKŞI; ÖZKAN; KOYUNCU, 2020).

Segundo descrição da Farmacopeia Brasileira (FB) (ANVISA, 2019), o bulbo é subgloboso, composto por 6 a 20 bulbilhos de diferentes tamanhos, reunidos sob um único involúcro composto por várias folhas protetoras escamosas inteiras e membranáceas, esbranquiçadas ou rosadas, que se destacam facilmente. Os bulbilhos estão inseridos em um pequeno caule, discoide, achatado, que apresenta em sua porção mediana superior um prolongamento que corresponde ao escapo. Cada bulbilho é envolvido por um prófalo escarioso e protetor, que circunda um catáfilo de reserva, carnoso e succulento. O prófalo escarioso é liso, contínuo, cartilaginoso, brilhante, e mais ou menos resistente. O catáfilo carnoso, quando seccionado transversalmente mostra em sua região mediana uma porção amarelada a amarelo-esverdeada, correspondente aos primórdios das folhas aéreas, conduplicados longitudinalmente. Em secção longitudinal, observa-se que estes primórdios preenchem a porção mais interna do bulbilho, no sentido basal-apical.

Outra parte, popularmente conhecida como casca do alho, é composta por diferentes estruturas vegetais (Figura 1). Recobrimo o bulbo há um involúcro composto por folhas protetoras escamosas e membranáceas, ao redor dos bulbilhos encontra-se o prófalo escarioso, que também tem a função de proteção. Há também na porção apical o escapo que é a porção terminal do caule da planta. E na região basal encontram-se fragmentos da raiz, visto que grande parte é retirada na colheita. Deste modo, trata-se de um material heterogêneo, composto de estruturas distintas que apresentam em geral uma natureza fibrosa (ANVISA, 2019).

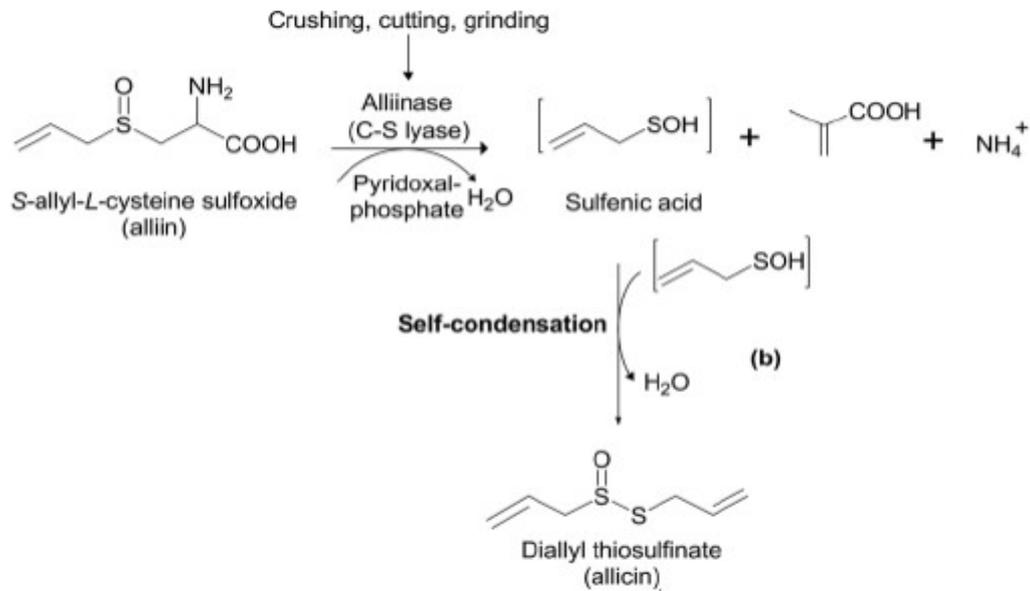
Figura 1 –Partes que compõe o bulbo do alho.



Fonte: Autora

O bulbo do alho é mundialmente empregado como ingrediente alimentar, é rico em alicina que confere ação antiviral, antifúngica e antibiótica, tem também, considerável teor de selênio atuando como antioxidante (LEONÊZ, 2008). Quando as células do alho são quebradas, libera-se uma enzima chamada allinase que modifica quimicamente a substância aliina em alicina (Figura 2) (ALMEIDA *et al.*, 2006). A alicina, além de conferir as características funcionais, também é a substância que confere o odor marcante do alho (óleo volátil sulfuroso). Outro ponto importante é que a alicina é altamente sensível a altas temperaturas e condições de pH alto (NAZARI *et al.*, 2019).

Figura 2 – Transformação de aliina em alicina através da enzima allinase.



Fonte: Trio *et al.*, 2014.

Alguns compostos sulfurados presentes no alho possuem atividade hipotensora, hipoglicemiante, hipocolesterolêmica e antiagregante plaquetária, reduzindo o risco de doenças cardiovasculares. As demais substâncias encontradas no alho possuem atividade imunoestimulatória e antineoplásica (BATIHA *et al.*, 2020).

Há milhares de anos *A. sativum* e seus extratos têm sido usados para tratar infecções. Diversos fitoquímicos bioativos foram identificados, destacando-se os compostos sulfurados, presentes em quantidades três vezes maiores que em outros vegetais como a cebola e o brócolis (EKŞI *et al.*, 2020).

Já foi relatado que o óleo de alho apresenta excelente atividade antibacteriana contra: *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Enteritidis*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (FRATIANNI *et al.*, 2016). No entanto, grande parte das pesquisas sobre *A. sativum* se limitam ao estudo do bulbo e seus bulbilhos. A casca de alho (constituída os prófilos e catafilos) apesar de contribuir com 25% do peso total da produção é considerada como um subproduto do processamento do bulbo, sendo geralmente descartada pela indústria (KIM *et al.*, 2009).

Estudos abordando a casca do alho envolvem a absorção e remoção de resíduos de soluções aquosas, tais como azul de metileno (HAMEED; AHMAD, 2009) e metais pesados como cobre (CHOWDHURY *et al.*, 2012) e chumbo (LIU *et al.*, 2014), também como uma alternativa aos adsorventes de desfluorinação (KAI *et al.*, 2011), na fabricação de baterias de

ion lítio (SELVAMANI *et al.*, 2016), e como inibidor da corrosão (PEREIRA *et al.*, 2012), porém ainda há uma escassez de estudos voltados para a extração de compostos e sua utilização como conservante natural em alimentos.

Estudos concluíram que os coprodutos da produção do alho, incluindo cascas e folhas são constituídos de 6,3% de lignina, 41% de celulose, 18% de hemicelulose (KALLEL *et al.*, 2016) e o extrato da casca de alho contém compostos fenólicos como o ácido cafeico, p-cumarico, ferúlico e di-ferúlico que estão associados à atividades antioxidantes e antibacterianas (ICHIKAWA *et al.*, 2003; KALLEL *et al.*, 2014).

Ifesan e colaboradores (2014) obtiveram efeito inibitório no crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Proteus vulgaris* em carne contendo extrato da casca do alho, obtido por imersão em álcool 80% após nove dias de estocagem. Ao se comparar extratos obtidos da casca do alho por diferentes solventes (água, metanol, etanol e 50/50 água e etanol e 50/50 água e metanol), sendo o extrato aquoso obtido por decocção, enquanto nos demais foi utilizado o método de imersão. Os extratos obtidos com a utilização do metanol puro ou diluído em água apresentaram maior teor de compostos fenólicos, atividade antioxidante, além de inibir o crescimento de bactérias patogênicas através do teste de disco difusão, tanto em gram positivas (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus thuringiensis*), como gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa*) (KALLEL *et al.*, 2014).

Apesar de existirem relatos na literatura que sugeriram o potencial antimicrobiano de extratos da casca do alho, não foram encontrados trabalhos que utilizassem os métodos de extração por turbolização e maceração, além de ainda não ter sido testada a metodologia da microdiluição na avaliação destes extratos, assim como a análise da toxicidade.

3.3 Métodos de extração de compostos bioativos

Os extratos são preparações concentradas, que possuem consistências diversas, obtidas de matérias-primas vegetais secas ou frescas e preparadas por processos que envolvem a utilização de solventes, a fim de separar os compostos vegetais solúveis existentes no material celular (AZWANIDA, 2015). Anteriormente à extração, normalmente é realizada a preparação do material vegetal a fim de evitar a contaminação da amostra, preservar as biomoléculas e homogeneizar o tamanho das partículas do material. Estas etapas são a lavagem, secagem e moagem. O processo de moagem é responsável por fracionar as amostras em partículas menores e com dimensões mais homogêneas, aumentando a área de contato do

soluto com o solvente, o que favorece a eficiência e a cinética da extração (SASIDHARAN *et al.*, 2011; AZWANIDA, 2015).

Os solventes mais utilizados nos processos de extração são água, álcool, metanol, glicerina, propilenoglicol ou misturas desses. A escolha do solvente para a extração dos compostos bioativos depende da polaridade da amostra, uma vez que o solvente com polaridade semelhante ao soluto proporcionará uma melhor dissolução (ALTEMIMI *et al.*, 2017).

Para se escolher um método de extração, deve-se avaliar a eficiência, a estabilidade das substâncias extraídas, a disponibilidade dos materiais e o custo do processo escolhido, considerando a finalidade do extrato a ser preparado (SILVA *et al.*, 2005). Os métodos convencionais de extração de produtos naturais podem ser feitos utilizando altas temperaturas (a quente), como os métodos de infusão, extração de Soxhlet e decocção, ou em temperaturas amenas (a frio) em que os principais métodos são a imersão, maceração, turbulização e percolação (STICHER, 2007; CHAN *et al.*, 2011; NGAHA NJILA *et al.*, 2017).

Sabe-se que a alicina é relatada como a principal substância que confere a ação antimicrobiana do bulbo do alho (LEONÊZ, 2008). Porém, a alicina é um composto termolábil (NAZARI *et al.*, 2019), deste modo devem ser utilizadas técnicas de extração a frio, devido à instabilidade da molécula, que pode sofrer alterações com a elevação da temperatura (SHARAPIN, 2000).

Entre os principais métodos de extração a frio, tem-se a maceração que é uma das técnicas extrativas mais utilizadas devido à sua simplicidade e custo reduzido. Neste processo o material vegetal, fica em contato com o solvente à temperatura ambiente, por um período de tempo determinado, sob agitação ocasional de modo a aumentar a difusão e facilitar a extração (AZMIR *et al.*, 2013). No entanto, este processo pode apresentar limitações quando os compostos a serem extraídos são pouco solúveis (SHARAPIN, 2000; NAVARRO, 2005).

Na turbulização ou turboextração, a extração acontece ao mesmo tempo com a drástica redução do tamanho da partícula do material vegetal, devido à aplicação de elevadas forças de cisalhamento. Esta técnica leva ao rompimento das células vegetais favorecendo a rápida dissolução dos compostos ativos, resultando em uma rápida extração e levando ao quase esgotamento do material vegetal. Alguns autores utilizam um liquidificador para pequenas quantidades, sempre atentando para a estabilidade da solução extrativa. Além da

eficiência do método, somam-se a simplicidade, rapidez e versatilidade, que permitem a fácil utilização dessa técnica em diversos processamentos. Entre as desvantagens está a difícil separação da solução extrativa por filtração, a possibilidade de geração de calor durante o procedimento, sugerindo-se a realização o controle da temperatura do processo, restringindo o emprego de líquidos voláteis e a limitação da técnica, quando se trata de materiais de elevada dureza (SIMÕES *et al.*, 2003; NAVARRO, 2005).

Para o bulbo do alho já foram utilizadas as técnicas de extração por maceração (SOUZA, 2010; HAYAT *et al.*, 2018), turbulização (MOURA, 2002), imersão (FONSECA *et al.*, 2014), entre outras. Para a casca do alho as técnicas de extração relatadas na literatura são a maceração (VIJAYAKUMAR *et al.*, 2019), infusão (PEREIRA *et al.*, 2012) e imersão em substâncias hidroalcolólicas, sendo 80/20 (álcool/água) (ICHIKAWA *et al.*, 2003; IFESAN *et al.*, 2014).

3.4 Bactérias causadoras de surtos alimentares

As Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) compõem um grave problema de saúde pública a nível mundial, sabe-se que existem aproximadamente 250 tipos de doenças alimentares e, muitas são causadas por micro-organismos patogênicos, dentre estes os principais agentes etiológicos responsáveis por estes surtos são as bactérias gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*, e as gram-negativas *Escherichia coli* e *Salmonella enteritidis*. Devido à sua maior susceptibilidade, optou-se por iniciar a análise de atividade antimicrobiana apenas com os microorganismos gram positivos.

3.4.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é uma bactéria patogênica Gram positiva, pertencente à família Micrococcaceae, são mesófilos, anaeróbios facultativos, imóveis, não produtor de esporos, podendo ser encapsulados ou não (FRANCO; LANDGRAF, 2002; JAY, 2005;). Este patógeno é comumente encontrado na pele e mucosas de animais e seres humanos. Desse modo, a contaminação dos alimentos ocorre normalmente através da manipulação direta dos alimentos por indivíduos infectados ou portadores assintomáticos (SOUSA *et al.*, 2014).

Apesar de *S.aureus* ser facilmente destruído na temperatura de pasteurização ou

cocção, suas toxinas, uma vez produzidas não são destruídas por esses processos podendo causar intoxicação alimentar se ingeridas. A intoxicação alimentar estafilocócica ou estafiloenterotoxemia geralmente apresenta sintomas como náusea, vômitos, cólicas e diarreia. Em casos mais graves pode ocorrer desidratação, dor de cabeça, dores musculares, e alterações sistêmicas levando à hospitalização. (SILVA *et al.*, 2010).

3.4.2 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes é um cocobacilo Gram positivo, anaeróbio facultativo e não formador de esporos (MIMS *et al.*, 1999). Sua temperatura ótima de crescimento é entre 30 °C e 37 °C. É uma bactéria muito resistente, podendo tolerar uma variação de pH entre 5 a 9 e sendo capaz de sobreviver em ambientes com baixa atividade de água e altas concentrações de NaCl. Outro fator importante é a sua capacidade de formar biofilmes em utensílios e superfícies e de infectar humanos, podendo causar a listeriose (PEREIRA; ROCOURT, 1993; LANDGRAF, 1997; LI *et al.*, 2018).

A listeriose é uma das infecções mais graves transmitidas por alimentos, com taxa de mortalidade de 20 a 30% dos casos. Estudos indicam que esta infecção afeta principalmente indivíduos imunocomprometidos e mulheres grávidas. Outro agravante, é que os alimentos normalmente associados com a transmissão da listeriose são, em geral, processados industrialmente, que possuem longa vida de prateleira em temperatura de refrigeração e que costumam ser consumidos sem cocção prévia, o que permite a multiplicação de *L. monocytogenes* no alimento e sua transmissão para o homem. (FAI *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2011).

3.5 Avaliação da toxicidade em extratos vegetais

A toxicidade é uma característica referente às substâncias químicas que podem apresentar um potencial de produzir danos aos organismos vivos, podendo estar relacionada com o tempo de exposição e concentração da substância (RODRIGUEZ *et al.*, 2009). A finalidade dos testes de toxicidade aguda é indicar a concentração de uma substância que pode ocasionar letalidade e imobilidade em um conjunto de indivíduos que estão sendo avaliados. A exposição dos indivíduos à substância testada em um intervalo de tempo que pode variar

entre 24 horas e 96 horas. Frequentemente utilizam-se animais aquáticos para ensaios de toxicidade, dentre eles, o microcrustáceo, *Artemia salina*. O ensaio de letalidade frente à *Artemia salina* é uma metodologia extensamente utilizada na linha de pesquisa de produtos naturais para avaliar o potencial tóxico de extratos e substâncias isoladas. Apesar de ser relativamente simples, este ensaio tem a capacidade de gerar informações de grande utilidade de forma rápida, econômica e com reprodutibilidade. Este teste é amplamente utilizado devido à sua simplicidade, baixo custo e confiabilidade (MARTINS *et al.*, 2021; TRIGUEIRO *et al.*, 2020).

De acordo com Meyer *et al.* (1982), extratos de plantas que apresentam concentração letal média acima de 1000 µg/mL são considerados atóxicos, quando a concentração letal média, capaz de matar 50% da população (CL50) for superior a 500 µg/mL considera-se baixa toxicidade, toxicidade moderada para CL50 entre 100 a 500 µg/mL e muito tóxico quando a CL50 foi inferior 100 µg/mL (AMARANTE *et al.*, 2011). Os resultados de CL50 em *Artemia salina* mostram forte correlação com valores encontrados em camundongos Swiss, o que mostra que esse bioensaio pode ser utilizado como ensaio preliminar de extratos vegetais (NUNES *et al.*, 2006; ARCANJO *et al.*, 2012).

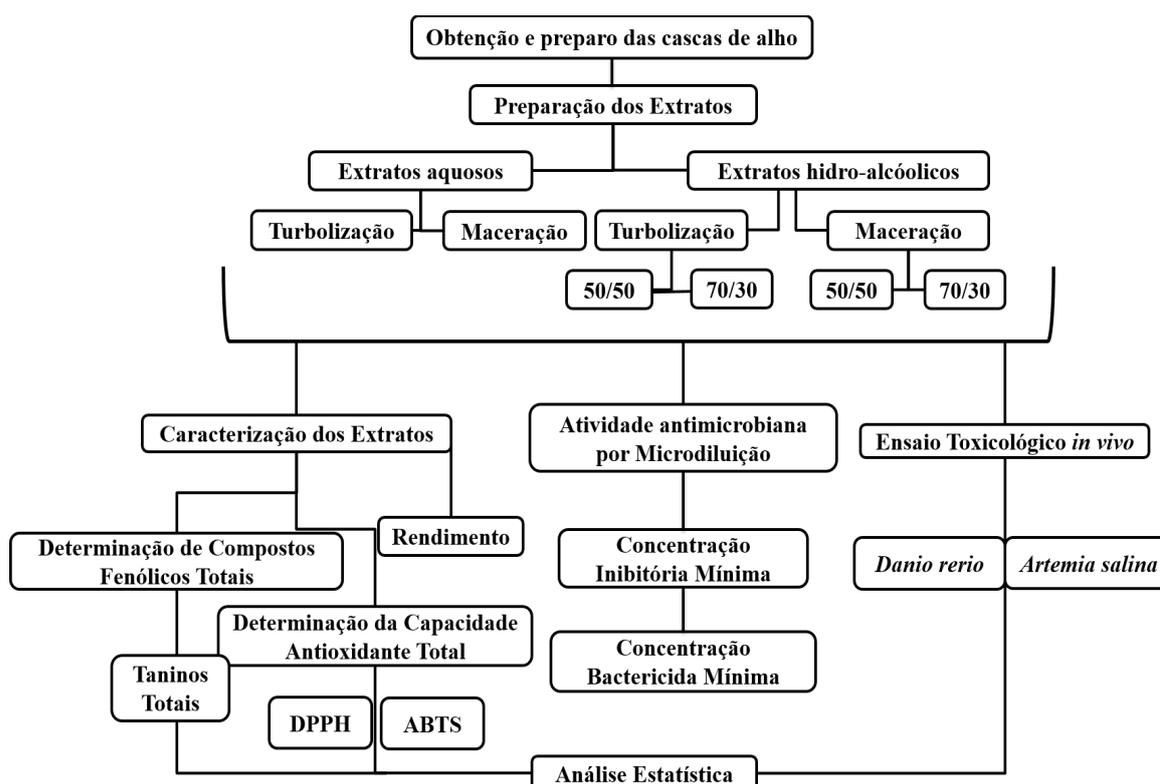
Outro animal que vem sendo extremamente utilizado em ensaios toxicológicos é o zebrafish (*Danio rerio*), que é considerado um modelo significativo, principalmente porque seu genótipo apresenta 70% de homologia exclusiva nos receptores de neurotransmissores para mamíferos (HOWE *et al.*, 2013). Outros fatores também contribuem para favorecer a sua utilização, como o seu pequeno tamanho, baixo custo, adaptabilidade diversa, ciclo de reprodução curto, alta fecundidade e embriões transparentes, podendo facilitar estudos utilizando este animal como modelo (FACCIOL; GERLAI, 2020; LEMOS *et al.*, 2021).

Um dos parâmetros para estudos comportamentais em larvas e animais adultos é a análise da atividade locomotora por exploração de um campo aberto (BICHARA *et al.*, 2014; FERREIRA *et al.*, 2020b). O teste de campo aberto é utilizado principalmente para analisar manifestações comportamentais sugestivas de ansiedade, estresse e o efeito de futuros fármacos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

As etapas de desenvolvimento do projeto estão apresentadas na figura abaixo:

Figura 3 – Fluxograma das etapas da metodologia do projeto.



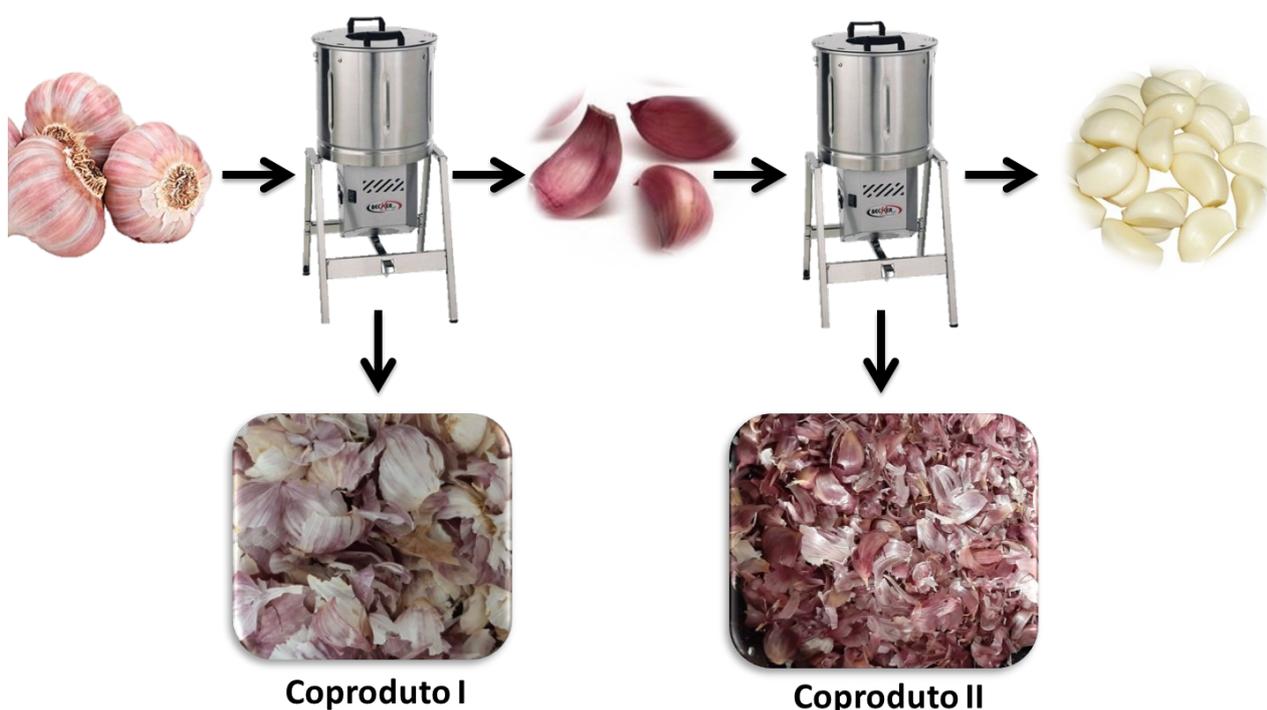
Fonte: Autora.

4.1 Obtenção das cascas de alho

As cascas do alho roxo foram cedidas pela empresa Alimempro Produtos Processados LTDA (Rodovia 020, Km 403, Lotes 23 e 24, Jurema, Caucaia), que comercializa diferentes produtos utilizando o bulbo do alho descascado. A empresa utiliza o descasque mecânico a seco em duas etapas, como demonstrado na figura 4. Primeiramente, os bulbos passam por uma máquina, em que são obtidos os bulbilhos encobertos do prófalo e o coproduto I, composto pelo invólucro de folhas escamosas, estame e raiz, também apresentando uma pequena parcela de prófilos. Após esse processo, os bulbilhos são descascados por uma segunda máquina que separa os bulbilhos descascados, que seguem para

o beneficiamento, e o coproduto II, composto majoritariamente pelos prófilos que revestem os bulbos, mas apresentando também as estruturas presentes no coproduto I em menor quantidade. Para este estudo foi escolhido trabalhar com o coproduto II, pois este é mais homogêneo e por ser menos susceptível à contaminação.

Figura 4 – Fluxograma do descasque mecânico dos bulbos de alho



Fonte: Autora.

4.2 Preparo das cascas do alho

A figura 5 demonstra o fluxograma do preparo das cascas de alho. Após o recebimento, o coproduto II foi peneirado para a remoção de pequenos fragmentos e sujidades, foram pesados 100g das cascas, lavadas em água corrente e deixadas de molho em solução de água clorada a 200ppm por 30 min. As cascas foram secas em estufa a 35°C por 48h, sendo homogeneizadas a cada 12h e armazenadas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz até o preparo dos extratos.

Figura 5 – Fluxograma do preparo das cascas de alho



Fonte: Autora.

4.3 Preparação dos extratos

Para a obtenção dos extratos aquosos e hidroalcoólicos todas as etapas de extração foram realizadas à temperatura ambiente, inicialmente o material vegetal foi triturado com o auxílio de um liquidificador com o intuito de reduzir o tamanho das partículas e facilitar a extração. Em ambos os métodos foram pesados 100g das cascas do alho e adicionado 1000 mL de água destilada ou solução hidroalcoólica (50% ou 70%), na proporção de 1:10 (soluto/solvente).

Para o método de turbolização foi utilizada a metodologia descrita por Moura (2002), com modificações. As cascas já trituradas foram incorporadas ao solvente com a utilização de um liquidificador pelo período de 1 minuto. Nos extratos por maceração, as cascas de alho previamente trituradas foram deixadas em contato com o solvente à temperatura ambiente por 16h e ao abrigo da luz.

Após a preparação dos extratos, as soluções foram filtradas em filtros de pano e, em seguida em filtros de papel para a retenção de partículas fibrosas. Os extratos hidroalcoólicos foram concentrados em evaporador rotativo (modelo Q344M, marca

QUIMIS) à 60°C para a retirada do álcool.

Os extratos aquosos e hidroalcoólicos obtidos foram dispostos em recipientes de polietileno, congelados e desidratados por liofilização (Modelo Beta 1- 8 LD plus, CHRIST) numa pressão de 0,025 mbar e temperatura de -40°C. Os extratos secos foram acondicionados em recipientes de polietileno opaco e armazenados a -12°C até o momento das análises.

Para a diluição dos extratos foi utilizado o polisorbato 80 (tween80) a 1% como tensoativo e a água destilada foi adicionada seguida de agitação em vórtex até a completa dissolução das soluções, correspondendo a uma concentração de 30mg/mL. As soluções foram submetidas a banho ultrassônico (modelo Odontobrás T1440, Ribeirão Preto, Brasil) operando a 40 kHz, potência nominal de 81 W, preenchido com 1,2 L e densidade de potência ultrassônica efetiva de 67,5 W/L durante 10 min, para facilitar a solubilização e reduzir a contaminação presente.

4.4 Caracterização dos extratos vegetais

4.4.1 *Rendimento dos extratos*

Após a obtenção dos extratos secos foi empregado o cálculo do rendimento, segundo Lima (2018), em porcentagem (%), empregando a fórmula a seguir:

Fórmula 1- Cálculo do rendimento dos extratos em %

$$Rt = \frac{P_{ext}}{P_c} \times 100$$

Onde: Rt = Rendimento total do extrato (%); P_{ext} = Peso do extrato seco (g);

P_c = Peso das cascas secas (g).

Fonte: Adaptado de Lima (2018).

4.4.2 Determinação de compostos bioativos

4.4.2.1 Quantificação de polifenóis totais

A determinação de compostos fenólicos totais foi realizada no laboratório de Frutos do Departamento de Engenharia de Alimentos, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará. Para a determinação dos compostos fenólicos totais utilizou-se a metodologia descrita por Larrauri *et al.* (1997), sendo todo o processo realizado ao abrigo da luz.

Primeiramente as soluções iniciais (extrato:água) foram preparadas na concentração final de 5 mg/mL. Em tubos de ensaio foram adicionadas alíquotas da solução inicial de acordo com cada extrato (100 µL para os extratos aquosos, 25 µL para o extrato de maceração com 70% de etanol, e 50 µL para os demais extratos hidroalcóolicos), foi adicionado água destilada até completar o volume de 0,5 mL. Foi adicionado 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteau na proporção de 1:3, seguido de 1 mL da solução de carbonato de sódio (Na₂CO₃) 20% e 1,0 mL de água destilada.

Em seguida, os tubos foram agitados em agitador vortex para adequada homogeneização e deixados em repouso protegidos da luz por 30 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Shimadzu, modelo UV-1800) a 700 nm e os resultados expressos em mg de ácido gálico equivalente (AGE) /100g de extrato. O teste foi realizado em triplicata.

4.4.2.2 Quantificação do teor de taninos totais

Para a quantificação de taninos totais presentes nos extratos da casca do alho (*Allium sativum L.*) foi utilizada a metodologia recomendada pela AOAC (CHEMISTS; HORWITZ, 1975). A análise de taninos foi realizada através da construção da curva padrão e das leituras das soluções, a uma absorvância de 760 nm, obtidas a partir das amostras com a utilização de ácido tânico, reagente de Folin-Denis e solução de carbonato de sódio a 20%, onde o teor de taninos totais foi expresso pela fórmula a seguir:

Fórmula 2- Cálculo do teor de taninos totais em (mg/100mL)

$$\text{Ácido Tânico (mg/100mL)} = \frac{C \times 100}{V}$$

V

Onde:

C= Concentração de ácido tânico na amostra correspondente à curva
padrão V= Volume em mL

4.4.2.3 *Quantificação de antocianinas totais e Flavonóides amarelos*

Foi utilizada a metodologia descrita por Francis (1982), em que 1 mL dos extratos (5mg/mL) foi adicionado em solução HCl 1,5 N e etanol 85%, as amostras foram homogeneizadas e o conteúdo transferido para um balão volumétrico de 50 mL ao abrigo da luz, o qual foi aferido com a solução extratora e transferido para um frasco âmbar. A solução foi submetida a 16 horas de repouso sob refrigeração e ausência de luz. Após esse período, o extrato foi filtrado em papel de filtro e submetido à leitura em espectrofotômetro (marca SHIMADZU, modelo UV-1800) a 535 nm para antocianinas totais e 374 nm para flavonóides amarelos. Os resultados foram expressos em mg/100 mL⁻¹ e calculados através das equações (1) e (2):

$$\text{Antocianinas totais (mg.100 mL}^{-1}\text{)} = (\text{absorbância} \times \text{diluição} \times 100) / \text{peso} \times 98,2. \text{Eq.(1)}$$

$$\text{Flavonóides amarelos (mg.100 mL}^{-1}\text{)} = (\text{absorbância} \times \text{diluição} \times 100) / \text{peso} \times 76,6. \text{Eq (2).}$$

4.4.3 *Determinação do potencial antioxidante total*

4.4.3.1 *Método da captura do radical sal de amônio do ácido 2,2 azinobis (3-etilbenzeno-6-sulfônico) (ABTS⁺)*

A análise de antioxidante foi realizada conforme metodologia descrita por Rufino *et al.* (2010), com modificações. Para realização do teste, os extratos da casca do alho foram diluídos em água destilada na concentração de 5mg/mL. Da solução inicial foram transferidas alíquotas de 6, 15 e 30µL para tubos de ensaio, em triplicata. Posteriormente, os tubos foram

completados com água destilada para volume de 100 μ L, adicionados de 3mL do radical ABTS e homogeneizados durante 6 minutos. Realizou-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro (Shimadzu, modelo UV-1800) a 734 nm, sendo utilizado o álcool etílico utilizado como branco. Os resultados foram expressos como capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman- 2-carboxylic acid) em μ M/g de extrato seco da casca do alho.

4.4.3.2 Ensaio do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

Foi utilizado o método descrito por Rufino *et al.* (2010), que consiste em monitorar o consumo do radical livre DPPH (0,06mM) através do decréscimo da absorbância de acordo com as concentrações dos extratos. Os extratos da casca do alho foram diluídos em água destilada e utilizados na concentração de 5mg/mL, com alíquotas de 0,1 mL adicionadas aos tubos de ensaio com 3,9 mL da solução etanólica de DPPH. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Shimadzu Modelo UV- 1800) a 515 nm, após a estabilização da absorbância. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados expressos de acordo com a concentração necessária do extrato (mg/L) capaz de reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH.

4.5 Atividade antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos aquosos sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* foi realizada pelo método de Microdiluição (BRANEN; DAVIDSON, 2004), descrito a seguir:

4.5.1 Preparo do inóculo

Foi utilizada a metodologia de LIMA (2018), sendo as cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 27664) e *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115) cultivadas no meio de manutenção Ágar Triptona de Soja - TSA a 35°C por 24 horas. Após este período foram selecionadas colônias isoladas de aproximadamente 1 mm de diâmetro, sendo estas colônias transferidas para tubos contendo 5 mL de Caldo Triptona de Soja - TSB. As culturas foram

incubadas a 35°C durante 24 horas em BOD (Biochemical Oxygen Demand, Quimis/Modelo Q316-M26) para a obtenção de uma concentração bacteriana final de aproximadamente 10^8 UFC/mL para cada microrganismo, utilizada para o teste de difusão em ágar.

A partir dessa concentração foram realizadas diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-7}) a fim de obter uma suspensão bacteriana de 10^5 UFC/mL, utilizada para os ensaios de microdiluição, onde foram determinadas as concentrações inibitórias mínimas (CIM) e concentrações bactericidas mínimas (CBM).

4.5.1.1 Teste de difusão em Ágar

A susceptibilidade bacteriana foi avaliada através do método qualitativo de difusão em ágar (CLSI, 2017), em que placas de Petri contendo ágar Mueller Hinton foram inoculadas com suspensões bacterianas de 10^8 UFC/mL dos microrganismos em estudo. Após 10 minutos, foram produzidos orifícios de aproximadamente 6 mm de diâmetro e 4 mm de profundidade, onde foram adicionadas alíquotas de 50 μ L das soluções dos extratos (30 mg/mL). Para o controle positivo foi utilizado os antibióticos amicacina (30 μ g) e gentamicina (10 μ g) Os halos de inibição do crescimento bacteriano foram medidos após a incubação a 35°C/24 horas.

Durante o teste de difusão em ágar foi observado o crescimento de colônias morfológicamente distintas, indicando a presença de contaminação, então também foi realizado a contagem padrão em placas, utilizando placas de petri estéreis contendo ágar TSA, em que as soluções dos extratos já dissolvidos foram testadas na concentração da dissolução inicial no intuito de investigar a contaminação das soluções, tanto antes como após a filtração em microfiltro de 0,22 μ L.

4.5.2 Atividade antimicrobiana por microdiluição

Para esta análise foram avaliados os parâmetros de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM), conforme metodologias descritas por Branen e Davidson (2004) e Brandt *et al.* (2010), com adaptações. Foram utilizadas placas de acrílico estéreis com 96 poços e capacidade de 300 μ L/poço. As soluções iniciais dos extratos foram preparadas com concentração máxima de 30 mg/mL, seguida por sua homogeneização em vórtex até sua completa dissolução e filtração em membrana estéril de 0,22 μ m. A partir

da solução inicial foram obtidas as demais concentrações utilizadas no teste da atividade antimicrobiana. Todas as análises foram realizadas em capela de fluxo laminar (Pachane/modelo 410) com seis repetições para cada lote de extrato.

4.5.2.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

As diluições seriadas dos inóculos foram distribuídas em alíquotas de 100 μL da suspensão bacteriana de 10^5 UFC/mL em cada poço para testar a atividade antimicrobiana. Em seguida, nos mesmos poços foram adicionadas alíquotas de 100 μL da solução antimicrobiana já diluída em água destilada estéril, de acordo com as concentrações estabelecidas anteriormente. Foram utilizados os seguintes poços controles: inóculo, meio de cultura e água (controle positivo) para avaliar a viabilidade do microrganismo testado, assim como poços contendo meio de cultura e soluções antimicrobianas nas concentrações testadas (controle das soluções) para verificar a inocuidade de cada solução. Ao término das distribuições dos tratamentos nas placas, as leituras das absorbâncias foram realizadas utilizando uma densidade óptica (D.O) de 630 nm (T=0) através de um leitor de absorbância em microplacas Elx 808 (Instruments BioTek, Inc. Winooski, VT, EUA). Em seguida, as placas foram incubadas a 35 ± 1 °C durante 24 horas. Após esse período, uma nova leitura (T=24) foi realizada. Foram consideradas como inibitórias as concentrações que apresentarem resultados cuja variação (Δ) das leituras fosse $\leq 0,05$ (BRANDT *et al.*, 2010).

4.5.2.2 Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)

A CBM foi determinada a partir dos poços que apresentaram concentração de efeito inibitório ($\leq 0,05$ nm). Foi utilizada a técnica de *Spread plate* a partir do espalhamento de uma alíquota de 100 μL de cada concentração das soluções antimicrobianas nas superfícies das placas contendo o meio Tryptcase Soya Ágar (TSA). Também foi utilizado o meio TSA para verificar o controle das soluções através uma alíquota de 100 μL espalhada na superfície da placa contendo Tryptcase Soya Ágar (TSA). Em seguida, as placas foram incubadas a 35 °C durante 48 horas em BOD (Biochemical Oxygen Demand, Quimis/Modelo Q316-M26). (BRANEN; DAVIDSON, 2004; BRANDT *et al.*, 2010). Após o período de incubação de 48 horas, aquelas concentrações que não apresentaram crescimento microbiano foram consideradas bactericidas, sendo a menor concentração com efeito bactericida

considerada a concentração bactericida mínima.

4.6 Avaliação da toxicidade dos extratos aquoso e hidroalcoólicos da casca do alho (*Allium sativum* L.)

4.6.1 Toxicidade *in vitro*

A toxicidade dos extratos sobre o microcrustáceo *Artemia salina* foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Meyer *et al.* (1982). No qual foram inoculados os cistos de *Artemia salina* em solução salina com concentração de 33 g/L e pH entre 8,0 e 9,0, a 27 °C sob iluminação de 100 W por 36 horas para a eclosão dos cistos.

Os extratos da casca do alho (*Allium sativum* L.) foram diluídos em solução salina nas concentrações de 10, 100, 500 e 1000 µg/mL para cada extrato e o pH ajustado para 8,0-9,0. Após a eclosão dos cistos, foram coletados 10 náuplios e transferidos para frascos transparentes contendo 5 mL da diluição dos extratos com solução salina. Foram utilizados 90 náuplios para cada concentração, que foram incubados a 27 °C sob iluminação de 100 W por 24 horas.

Após esse período a taxa de sobrevivência dos náuplios foi verificada e calculada a CL₅₀ (concentração letal de 50%) de acordo com o método PROBIT em que valores de CL50 menores que 1000 µg/mL classificam o extrato como tóxico. Foi utilizado software Statistica 13.0 com 95% de confiança.

4.6.2 Toxicidade *in vivo*

Os testes de toxicidade *in vivo* utilizando Zebrafish (*Danio rerio*) adulto basearam-se nos protocolos propostos por Magalhães *et al.* (2017). Para realização do ensaio foram utilizados zebrafish (*Danio rerio*) adultos, selvagens, de ambos os sexos com idade de 60 a 90 dias, tamanho de 3,5 ± 0,5 cm e peso 0,4 ± 0,1 g. Grupos de 50 peixes foram aclimatados por 24 h em aquários de vidro, contendo água desclorada e bombas de ar com filtros submersos, a 25°C e pH 7,0, com ciclo cicardiano de 14 horas de claro/10 horas de escuro. Os peixes foram alimentados com ração (Spirulina®) *ad libitum* 24h antes dos experimentos. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética do

Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC), sob protocolo CEUA nº 5639090320.

O teste de Campo Aberto foi realizado para avaliar a alteração ou não da coordenação motora dos animais, seja por sedação e/ou relaxamento muscular (AHMAD; RICHARDSON, 2013). Os animais (n=6/grupo) foram selecionados aleatoriamente, transferidos para uma esponja úmida e tratados com 20 µL, via oral, dos extratos EMH50%, EMH70%, ETH50%, ETH70% extratos nas seguintes concentrações: 5 mg/mL (CBM), 15 mg/mL (o triplo) e 25 mg/mL (quíntuplo). Também houve um grupo (n=6) de animais sem tratamento (Controle negativo; Naive), um grupo tratado com água destilada (veículo) e um grupo tratado com diazepam a 5 mg/mL (Controle sedativo). O grupo controle (água destilada estéril) foi utilizado como referência para o cálculo da atividade locomotora. (COLLYMORE *et al.*, 2013).

Após a administração dos extratos, os grupos animais (n=6) foram acondicionados individualmente em copos de plástico (250 mL) contendo 150 mL de água do aquário para repouso. Decorrido 1 hora, os animais foram mantidos em placas de Petri de vidro (10 x 15 cm), contendo a mesma água do aquário, marcadas com quatro quadrantes para a análise da atividade locomotora através da contagem do número de cruzamento de linhas (CL) individualmente durante 5 minutos. Utilizando o valor de CL do grupo Naive como linha de base (100%), foi calculada a porcentagem de atividade locomotora (AL%).

O estudo da toxicidade aguda foi realizado frente ao zebrafish (*D. rerio*) adulto conforme metodologias propostas pela OECD (OECD, 1992) e HUANG *et al.* (2014). Os animais (n=6/cada) foram tratados com as mesmas concentrações utilizadas no teste de campo aberto, porém os peixes foram deixados em repouso por 96 horas para analisar a taxa de mortalidade. Após as 96h, foi anotado o número de peixes mortos em cada grupo e determinado a concentração letal capaz de matar 50% dos animais (CL₅₀) através do método matemático Trimmed Spearman-Kärber com intervalo de confiança de 95% (ARELLANO-AGUIAR *et al.*, 2015).

4.7 Análises estatísticas

Os resultados das análises de compostos fenólicos totais e determinação da capacidade antioxidante total foram analisados por análise de variância e os níveis de

significância determinados pelo Teste de Tukey com 5% de probabilidade, utilizando o programa Statistica 13.0.

Para a análise do Teste de Campo Aberto, os resultados foram expressos como valores da média \pm erro padrão da média para cada grupo de 6 animais e submetidos à análise de variância (ANOVA unidirecional), seguido do Teste de Tukey a 5% probabilidade pelo programa GraphPad Prism v. 5.01.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Rendimento dos extratos

Os rendimentos dos extratos obtidos da casca do alho (*Allium sativum L.*) estão apresentados na Tabela 1. O solvente utilizado bem como o método de extração demonstrou interferir no rendimento dos extratos.

Tabela 1 – Rendimento de extratos obtidos da casca do alho (*Allium sativum L.*).

| Extratos | Rendimento (%) |
|----------|----------------|
| EMAQ | 7,56 |
| EMH50% | 2,23 |
| EMH70% | 1,07 |
| ETAQ | 5,14 |
| ETH50% | 1,88 |
| ETH70% | 0,99 |

EMAQ= Extrato aquoso obtido por maceração; EMH50%= Extrato hidroalcolico (50%) obtido por maceração; EMH70%= Extrato hidroalcolico (70%) obtido por maceração; ETAQ= Extrato aquoso obtido por turbolização; ETH50%= Extrato hidroalcolico (50%) obtido por turbolização; ETH70%= Extrato hidroalcolico (70%) obtido por turbolização.

No presente estudo foram encontrados rendimentos que variaram de 0,99% e 7,56%, sendo os maiores rendimentos obtidos com a utilização do solvente aquoso, responsável por otimizar o processo de extração devido à dissolução de compostos polares presentes em diferentes estruturas vegetais (BENELLI *et al.*, 2010). A utilização da água como solvente apresenta uma série de vantagens por ser atóxica, acessível, de baixo custo e não agredir o meio ambiente, também se destacando pela economia de tempo e energia ao não requerer a etapa de evaporação/concentração, que também contribui para um menor rendimento dos extratos hidroalcolicos (GIL-CHÁVEZ *et al.*, 2013).

O método extrativo também interferiu no rendimento de extração, onde os extratos da casca do alho obtidos pelo método de maceração obtiveram um melhor

rendimento em relação aos extratos obtidos por turbolização. A técnica de maceração possibilita um período maior de contato entre soluto e solvente, o que pode resultar em uma melhor extração.

Além do método extrativo e do solvente utilizado, outros fatores podem influenciar diretamente no rendimento dos extratos vegetais, tais como o tipo de tecido vegetal empregado, o tempo e temperatura de exposição (RIBEIRO, 2011).

5.2 Teor de compostos bioativos em extratos da casca de *Allium sativum L.*

Os resultados referentes aos conteúdos de compostos bioativos dos extratos obtidos da casca de *Allium sativum L.* são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Teor de compostos bioativos de extratos obtidos da casca de *Allium sativum L.*

| Extratos | Compostos Fenólicos Totais (mg AGE/100g) | Taninos Totais (mg ATE/g) | Flavonóides Totais (mg/100mL) | Antocianinas Totais (mg/100mL) |
|----------|--|----------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| EMAQ | 3910,98±140,64 ^f | 434,33±7,52 ^c | 0,4820±0,0878 ^b | 0,3157±0,0269 ^{b,c} |
| EMH50% | 12022,35±106,79 ^b | 1003,02±35,75 ^b | 0,9063±0,0204 ^a | 1,3204±0,0655 ^a |
| EMH70% | 14657,42±557,48 ^a | 1688,94±4,68 ^a | 0,7604±0,1800 ^a | 1,1711±0,1683 ^a |
| ETAQ | 4989,98±216,38 ^c | 486,21±10,55 ^c | 0,3768±0,0269 ^c | 0,4956±0,0386 ^b |
| ETH50% | 7945,28±135,48 ^c | 600,27±5,41 ^d | 0,7060±0,0979 ^{a,b} | 0,1358±0,0358 ^c |
| ETH70% | 6203,47±516,49 ^d | 833,55±22,49 ^c | 0,8859±0,0176 ^a | 0,2885±0,0386 ^{b,c} |

Resultados expressos em média ± desvio padrão (n=3). AGE= ácido gálico equivalente. ATE= ácido tânico equivalente. Diferentes letras em uma mesma coluna representam amostras significativamente diferentes (p<0,05). EMAQ= Extrato aquoso obtido por maceração; EMH50%= Extrato hidroalcoólico (50%) obtido por maceração; EMH70%= Extrato hidroalcoólico (70%) obtido por maceração; ETAQ= Extrato aquoso obtido por turbolização; ETH50%= Extrato hidroalcoólico (50%) obtido por turbolização; ETH70%= Extrato hidroalcoólico (70%) obtido por turbolização.

Os extratos vegetais podem ser classificados de acordo com o teor de compostos fenólicos em três grupos, sendo amostras de baixo teor (< 100 mg AGE/100 g), moderado teor (200-500 mg AGE/100 g) e alto teor (> 1000 mg AGE/100 g) (WEBER *et al.*, 2021). Todos os extratos da casca do alho estudados obtiveram altos teores de fenólicos totais, com valores variando de 3910,98 a 14657,42 mg AGE/100 g de extrato. Estes altos teores de compostos estão relacionados a um alto potencial antioxidante e possíveis efeitos bacteriostático e bactericida.

Os extratos hidroalcoólicos obtiveram valores significativamente superiores ($p < 0,05$) aos extratos aquosos e observando os extratos obtidos pela técnica de maceração (EMAQ, EMH 50% e EMH70%) constatou-se que o aumento do percentual de etanol resultou na elevação do teor dessas substâncias. Em estudo desenvolvido por Kallel *et al.* (2014), extratos obtidos da casca do alho pela técnica de imersão utilizando etanol e metanol como solventes apresentaram teor de compostos fenólicos significativamente superiores ao extrato aquoso obtido por decocção, demonstrando que a utilização de etanol como solvente pode potencializar a extração destes compostos.

A extração de compostos fenólicos totais é fortemente dependente do tipo de solvente utilizado, bem como, as concentrações empregadas (JAKOPIC; STAMPAR; VEBERIC, 2009). Esta variação se deve à polaridade dos solventes utilizados, em que normalmente a solução aquosa de etanol apresenta melhores resultados devido à sua atuação como extrator bipolar (MICHIELS *et al.*, 2012; ZŁOTEK *et al.*, 2016). Diversos trabalhos concluíram que soluções aquosas de etanol, metanol, propanol, acetato de etila ou acetonas apresentam ser melhores na extração de fenólicos totais, quando comparadas a um sistema de extração contendo um solvente como composto único (JAKOPIC; STAMPAR; VEBERIC, 2009; ALBUQUERQUE *et al.*, 2021), corroborando com os resultados desse estudo.

Com relação ao método de extração empregado, os extratos obtidos pelo método de maceração apresentaram melhores resultados em comparação ao método de turbulização, exceto nos extratos aquosos, onde o ETAQ apresentou 4989,98 mg AGE/100 g, enquanto o EMAQ, 3910,98 mg AGE/100 g, sendo significativamente diferentes. Estes resultados indicam que a técnica de maceração associada a utilização de etanol potencializa a extração de compostos fenólicos presentes na casca do alho, possivelmente devido ao longo período de interação do solvente com o material vegetal, possibilitando a ligação do etanol com os grupamentos hidroxila característicos dos compostos fenólicos.

A técnica de turbulização possibilita o rápido rompimento das células vegetais e o aumento da superfície de contato da amostra com o líquido solvente, o que potencializa o processo extrativo, garantindo que a maior parte dos metabólitos secundários seja transferido da matriz vegetal para o sistema solvente concomitantemente à sua interação com o solvente (NAVARRO, 2005). No entanto esta característica também pode levar ao esgotamento do material e à extração de outros compostos como as fibras, tornando o extrato mais espesso e de difícil filtração. A associação destes fatores possivelmente contribuiu para que a utilização de etanol 50% tenha sido mais eficiente para a extração de compostos fenólicos que apenas a água como solvente, ou etanol 70%.

O teor de compostos fenólicos obtido nesse trabalho foi superior ao relatado em outros trabalhos utilizando extratos da casca do alho obtidos por diferentes métodos. Tanto em extratos aquosos obtidos com uso de calor (KALLEL *et al.*, 2014; NODA *et al.*, 2019), como em extratos obtidos por imersão utilizando como soluções de 50% ou 100% de etanol e metanol (KALLEL *et al.*, 2014) e cascas de alho imersas em etanol 80% por nove dias (IFESAN *et al.*, 2014). Além disso, a proporção de cascas de alho utilizada por solvente foi menor nestes trabalhos, o que pode justificar os melhores resultados obtidos no presente estudo.

Os valores de compostos fenólicos obtidos neste estudo foram superiores aos obtidos em extratos da casca do alho utilizando etanol como solvente em um sistema de extração de alta pressão (CHHOUK *et al.*, 2017). Kim *et al.* (2013) também obtiveram menor teor de compostos fenólicos ao analisar o alho negro, que é o resultado da aplicação de um processo de maturação sob altas temperaturas ao bulbo do alho.

5.2.1 Teor de taninos totais em extratos da casca do alho (*Allium sativum* L.)

Os resultados obtidos (Tabela 2) estão de acordo com o teor de compostos fenólicos, em que foi possível observar que a quantidade de taninos extraídos aumentou de acordo com a elevação do percentual de etanol utilizado, sendo os extratos EMH70% e ETH70%, significativamente superiores aos extratos EMH50% e ETH50%, assim como estes em relação aos extratos aquosos.

Nos extratos hidroalcoólicos a técnica de maceração foi capaz de extrair mais taninos em comparação com a turbolização, no entanto ao comparar os extratos aquosos não houve diferença estatística entre os métodos de extração. Dentre os tratamentos o extrato que obteve maior extração de taninos totais foi o EMH70% (1688,94 EAT/g), que também apresentou o melhor resultado de teor de compostos fenólicos.

BIN *et al.* (2020) testaram o efeito de diferentes solventes para a extração de compostos do bulbo do alho, sendo etanol, hexano, acetona, água e éter, em que apenas os extratos utilizando água, etanol e éter apresentaram taninos em sua composição. Outro estudo semelhante também avaliou diferentes solventes na preparação de extratos do bulbo de *Allium sativum* L., onde apenas o extrato aquoso demonstrou a presença de taninos, enquanto as demais substâncias (hexano, metanol, acetato de etila e clorofórmio) não apresentaram este composto (MERIGA; MOPURI; MURALIKRISHNA, 2012).

Apesar de outros trabalhos já relatarem a presença de taninos em alho (*Allium*

sativum L.), estes costumam utilizar apenas o bulbo e realizam testes apenas qualitativos, mas sugerem que a utilização de etanol e água possa ser eficiente para a extração desses compostos. Além disso, ao analisar o extrato etanólico das folhas do alho, Fonseca *et al.* (2019) não observaram a presença de taninos, demonstrando que os taninos podem variar de acordo com a região da planta. Desta forma, a utilização das cascas de alho apresenta uma boa opção como fonte para a extração de taninos, o que sugere que também possa apresentar outros efeitos comumente ocasionados por estes compostos, como a ação anti-inflamatória (VIJAYAKUMAR *et al.*, 2019).

5.2.2 Quantificação de antocianinas e flavonoides

Os extratos da casca do alho (*Allium sativum L.*) obtiveram resultados variando entre 0,3768 e 0,9063 mg/100 mL para flavonoides amarelos (Tabela 2). Com relação ao método de extração, este não apresentou diferença estatística entre os extratos hidroalcolócos, no entanto nos extratos aquosos a técnica de maceração gerou resultado significativamente superior ao extrato aquoso obtido por turbolização. Os resultados obtidos neste trabalho foram superiores aos encontrados em outros estudos com extratos da casca do alho obtidos por imersão e decocção (KALLEL *et al.*, 2014).

Com relação ao solvente utilizado, embora os extratos hidroalcolócos não tenham diferido entre si em relação ao percentual de etanol, todos apresentaram resultados significativamente superiores ($p < 0,05$) aos extratos aquosos, com exceção de ETH50% e EMAQ, que não diferiram entre si. Kallel *et al.* (2014) avaliaram o teor de flavonoides em extratos da casca de alho e também obtiveram resultados superiores para o extrato hidroalcolóco em relação ao extrato aquoso. Ao analisar a presença destes compostos em alho negro, Kim *et al.* (2013) obtiveram alto teor de flavonóides variando de aproximadamente 600 a 800mg equivalente à quercetina/Kg, observando o aumento desse valor de acordo com o tratamento térmico, indicando que a utilização de calor pode aumentar a extração destes compostos.

Os extratos da casca do alho obtiveram resultados variando entre 0,4956 e 1,3204 mg/100 mL de antocianinas totais (Tabela 2). A utilização do método de maceração associado à utilização de solução hidroalcolóca como solvente demonstrou alta eficácia para a obtenção de antocianinas, pois os extratos EMH50% e EMH70% obtiveram resultados significativamente superiores aos demais tratamentos. No entanto, para os extratos aquosos, o

método de extração não apresentou diferença estatística ($p > 0,05$). Em relação ao percentual da solução solvente utilizada não foi observado diferença significativa entre os extratos elaborados com 50% ou 70% de etanol.

A avaliação de compostos bioativos oriundos de extratos vegetais é uma importante etapa das pesquisas de produtos naturais, pois a quantidade destes compostos está relacionada aos extratos com maior potencial antioxidante e antimicrobiano, e a eficiência na extração destes compostos depende de inúmeros fatores, tais como o método utilizado e o solvente extrator (GARCIA-VAQUERO *et al.*, 2020), justificando dessa forma, as diferenças estatísticas significativas obtidas entre os métodos e solventes empregados na extração em relação à quantificação de compostos bioativos da casca do alho.

A grande quantidade de compostos bioativos encontrados nos extratos hidroalcoólicos da casca do alho com o método de maceração, obtidos neste trabalho, demonstram que esta técnica de extração apresentou-se mais efetiva para a obtenção destes compostos. Além de incentivar mais estudos e sua aplicação da casca do alho na indústria de alimentos, ao demonstrar o potencial desta matriz vegetal normalmente subutilizada por se tratar de um resíduo da indústria de processamento de alho.

5.3 Avaliação do potencial antioxidante

Os resultados referentes ao potencial antioxidante dos extratos obtidos da casca do alho através das análises da captura dos radicais livres ABTS e DPPH estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 –Potencial antioxidante de extratos obtidos da casca do alho (*Allium sativum L.*).

| | $\mu\text{M Trolox/g extrato}$ | $\text{EC}_{50} \text{ g extrato/L}$ |
|--------|--------------------------------|--------------------------------------|
| EMAQ | $342,57 \pm 7,45^c$ | $3,57 \pm 0,02^a$ |
| EMH50% | $658,06 \pm 70,68^b$ | $3,00 \pm 0,06^c$ |
| EMH70% | $810,37 \pm 81,55^a$ | $2,11 \pm 0,04^d$ |
| ETAQ | $368,07 \pm 22,69^c$ | $3,29 \pm 0,06^b$ |
| ETH50% | $608,86 \pm 72,22^b$ | $3,18 \pm 0,02^b$ |

| | | |
|--------|-----------------------------|--------------------------|
| ETH70% | 293,40 ± 21,47 ^c | 3,58 ± 0,03 ^a |
|--------|-----------------------------|--------------------------|

Resultados expressos em média ± desvio padrão (n=3). EC₅₀= Concentração mínima necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH. Diferentes letras em uma mesma coluna representam amostras significativamente diferentes (p<0,05). EMAQ= Extrato aquoso obtido por maceração; EMH50%= Extrato hidroalcolico (50%) obtido por maceração; EMH70%= Extrato hidroalcolico (70%) obtido por maceração; ETAQ= Extrato aquoso obtido por maceração; ETH50%= Extrato hidroalcolico (50%) obtido por turbolização; ETH70%= Extrato hidroalcolico (70%) obtido por turbolização.

No ensaio com o radical ABTS os extratos da casca do alho variaram de 293,40 a 810,37 µM/g, sendo o maior valor obtido pelo extrato EMH70%, condizendo com o resultado de compostos fenólicos, indicando a ação antioxidante destes. Nos extratos obtidos por maceração pode-se observar que o aumento no percentual de etanol resultou na elevação da atividade antioxidante. No entanto para os extratos de turbolização o ETH50% foi estatisticamente superior à ETH70% e ETAQ, sem diferir significativamente do EMH50%. Não houve diferença significativa entre os extratos aquosos, que apresentaram resultados inferiores a todos os extratos hidroalcolicos, com exceção de ETH70%. Nas análises de compostos bioativos os extratos aquosos também apresentaram valores inferiores, mas o ETH70% obteve melhores resultados, demonstrando que o potencial antioxidante depende de diversos fatores, não somente do teor destes compostos.

Bergamaschi (2010) testou a capacidade antioxidante de extratos aquosos e hidroalcolicos de diferentes resíduos vegetais, obtendo valores entre 3,19 e 990,79 µM Trolox/g extrato, e na maioria das espécies vegetais o extrato utilizando etanol como solvente obteve um melhor resultado em relação ao extrato aquoso, semelhante aos resultados obtidos neste trabalho.

Para os ensaios com o radical DPPH, observou-se que quanto maior o consumo do radical, menor a concentração efetiva dos extratos capaz de neutralizar em 50% a ação do radical (CE₅₀), caracterizando um grande potencial antioxidante dos extratos, que obtiveram valores de CE₅₀ variando entre 2,11 e 3,57 g/L.

O menor valor de CE₅₀ foi obtido pelo extrato EMH70% (2,11 g/L) seguido pelo EMH50% (3 g/L). Estes resultados estão de acordo com o alto teor de compostos bioativos encontrados nestes extratos, o que se justifica pela ação antioxidante dos compostos fenólicos presentes (LI *et al.*, 2006).

Para os extratos aquosos, o extrato obtido pelo método de turbolização apresentou maior potencial antioxidante, diferindo estatisticamente do extrato obtido por maceração. O ETAQ apresentou resultado similar ao ETH50%, não diferindo significativamente deste,

valorizando a possibilidade da utilização de água como solvente extrator. ETH70% obteve valor de EC₅₀ superior ao demais, sem diferir apenas do EMAQ, demonstrando um baixo potencial antioxidante.

Embora o valor de EC₅₀ encontrados nos extratos seja um valor baixo, outros estudos avaliando extratos da casca do alho (KALLEL *et al.*, 2014; CHHOUK *et al.*, 2017; NODA *et al.*, 2019) obtiveram valores de EC₅₀ ainda menores, demonstrando como o método de extração pode interferir neste resultado.

Alguns compostos que têm atividade de eliminação do radical ABTS podem não apresentar a mesma atividade em relação ao radical DPPH, baseado na ação de diferentes cátions para a reação com estes radicais. Estudos concluíram que os antioxidantes hidrofílicos e de alta pigmentação são melhores refletidos pelo ensaio ABTS⁺, em relação ao método do DPPH, além de que diferentes métodos de análise do potencial antioxidante podem gerar diferentes resultados, visto que os compostos interagem de modo diferentes com cada substância (GABER; EL-DAHY; SHALABY, 2021).

5.4 Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos da casca de *Allium sativum L.*

5.4.1 Teste de difusão em ágar

Preliminarmente à análise da atividade antimicrobiana por microdiluição, os extratos da casca do alho foram testados utilizando a técnica de difusão em ágar, com resultados apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Atividade antimicrobiana de extratos da casca de *Allium sativum L.* testados por difusão em ágar

| Extratos (30mg/mL) | Halo de inibição (mm) | |
|--------------------|-----------------------|-------------------------|
| | <i>S. aureus</i> | <i>L. monocytogenes</i> |
| EMAQ | - | - |
| ETAQ | 7 | - |
| EMH50% | 16 (BD) | 7 |

| | | |
|--------------------|----|----|
| ETH50% | 12 | - |
| EMH70% | 10 | 8 |
| ETH70% | 10 | 11 |
| Gentamicina (10µg) | 23 | 25 |
| Amicacina (30µg) | 27 | 25 |

Resultados expressos em milímetros contados do centro até a borda do halo de inibição. BD = Baixa densidade
 EMAQ= Extrato aquoso obtido por maceração; EMH50%= Extrato hidroalcolico (50%) obtido por maceração;
 EMH70%= Extrato hidroalcolico (70%) obtido por maceração; ETAQ= Extrato aquoso obtido por
 turbolização; ETH50%= Extrato hidroalcolico (50%) obtido por turbolização; ETH70%= Extrato hidroalcolico
 (70%) obtido por turbolização.

A bactéria *Listeria monocytogenes* não apresentou susceptibilidade aos extratos aquosos ETAQ e EMAQ, e em relação aos extratos hidroalcolicos apenas ETH50% não demonstrou efeito inibitório frente à *L. monocytogenes*, enquanto EMH50%, EMH70% e ETH70% demonstraram halo de inibição de 7, 8 e 11 mm, respectivamente, o que representa atividade antimicrobiana para esse microrganismo. Para *S. aureus* constatou-se susceptibilidade frente a todos os extratos estudados, exceto EMAQ. ETAQ obteve halo de 7mm, no entanto apresentou indicativos de contaminação e EMH50% obteve um halo de 16mm, porém sem inibição total, apenas uma zona de baixa densidade. Os demais extratos demonstraram boa capacidade de inibir o crescimento de *S. aureus*, ETH50% apresentou halo de 12mm e para os extratos ETH70% e EMH70% o raio de inibição foi de 10 mm para cada.

Os extratos aquosos, tanto de maceração, como turbolização, além de demonstrarem baixa inibição em relação aos microrganismos gram-positivos testados, também apresentaram alta contaminação, constatado ao realizar a contagem padrão em placas, onde foram observadas diferentes colônias características de bactérias, bolores e leveduras, com número de unidades formadoras de colônias (UFC) maior que 1×10^5 UFC/g, mesmo após aplicação de ultrassom de banho e filtração. Dessa forma, além de demonstrarem baixa atividade antimicrobiana, sua alta carga microbiana (própria do material vegetal) também impossibilita uma futura aplicação em alimentos, pois pode vir a deteriorar o produto. Portanto foi decidido não dar continuidade aos testes de atividade antimicrobiana por microdiluição dos extratos aquosos.

Este resultado de ETAQ e EMAQ está de acordo com a menor quantidade de compostos fenólicos totais e taninos totais obtidos nestes extratos, pois estes compostos possuem atividade antimicrobiana, e a utilização da água como solvente apresentou uma menor capacidade de extrair estes compostos dos perfis de alho, o que pode ter acarretado

na redução do potencial antibacteriano destes extratos. Kallel *et al.* (2014) observaram que o extrato aquoso obtido pela decocção das cascas de alho apresentou halo de inibição em relação à *S. aureus* semelhante aos extratos obtidos por imersão em etanol absoluto e 50%.

5.4.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A CIM pode ser descrita como a menor concentração de uma substância capaz de limitar o crescimento visível de uma bactéria, enquanto a CBM corresponde à concentração mínima a partir da qual um agente apresenta ação bactericida, sendo que quanto mais próximos forem os valores destas variáveis, mais letal será o antibiótico (BONA *et al.*, 2014).

Estes conceitos são de extrema relevância para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos, pois permitem avaliar a ação destas substâncias. Foram testados os efeitos das concentrações de 1 a 8 mg/mL dos extratos sobre os microrganismos gram-positivos *S. aureus* e *L. monocytogenes* e os resultados obtidos estão expressos na Tabela 5.

Tabela 5 - Atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos da casca de *Allium sativum* L.

| | <i>S. aureus</i> | | <i>L. monocytogenes</i> | |
|--------|------------------|-------------|-------------------------|-------------|
| | CIM (mg/mL) | CBM (mg/mL) | CIM (mg/mL) | CBM (mg/mL) |
| EMH50% | 5 | >8 | >8 | >8 |
| ETH50% | 4 | 4 | 4 | 5 |
| EMH70% | 4 | 4 | 5 | >8 |
| ETH70% | 2 | 3 | 5 | 5 |

CIM= Concentração Inibitória Mínima; CBM= Concentração Bactericida Mínima EMH50%= Extrato hidroalcoólico (50%) obtido por maceração; EMH70%= Extrato hidroalcoólico (70%) obtido por maceração; ETH50%= Extrato hidroalcoólico (50%) obtido por turbulização; ETH70%= Extrato hidroalcoólico (70%) obtido por turbulização.

S. aureus apresentou alta susceptibilidade aos extratos obtidos dos perfis de alho, apresentando concentração inibitória mínima variando entre 2 e 5 mg/mL (Tabela 5), resultado de acordo com outros trabalhos que obtiveram efeito inibitório ao testar extratos do bulbo do alho sobre *S. aureus* (RASTOGI; ARUNACHALAM, 2011; VIJAYAKUMAR *et*

al., 2019). Além disso, também foi observado efeito bactericida, em alguns casos a CIM e CBM foi a mesma, demonstrando a capacidade destes extratos de afetar o metabolismo bacteriano diretamente, mesmo em baixas concentrações. Levando em consideração que o bulbo de alho possui alto valor comercial, enquanto as cascas ainda não são largamente utilizadas pela indústria, ressalta-se a importância destes resultados, demonstrando o potencial antimicrobiano da casca do alho, podendo ampliar a sua utilização, evitando o desperdício deste material vegetal, além de proporcionar um retorno financeiro ao agregar valor à este resíduo.

L. monocytogenes também apresentou susceptibilidade aos extratos hidroalcoólicos testados, ainda que em concentrações ligeiramente superiores, variando de 4 a 5 mg/ml (Tabela 5). Apesar de outros trabalhos já demonstrarem o efeito de *Allium sativum L.* sobre estes microrganismos (PINILLA; BRANDELLI, 2016), ainda não havia sido testado a concentração inibitória e bactericida mínima em relação à extratos utilizando apenas a casca do alho.

FERREIRA *et al.* (2020^a) analisaram o potencial antimicrobiano de diferentes espécies de plantas medicinais, obtendo valores de CIM variando de 0,5 a 2,8 mg/mL e 1 a 14 mg/mL; e CBM variando de 0,5 a 2,8 mg/mL e 1,2 a 3 mg/mL, para *S. aureus* e *L. monocytogenes*, respectivamente. Sendo que o extrato de *Croton nepetaefolius* não apresentou efeito bactericida frente à *L. monocytogenes*. Deste modo percebe-se a relevância dos resultados obtidos neste trabalho por se tratar de um subproduto da indústria sem valor comercial, portanto os resultados deste trabalho sugerem uma potencial utilização das cascas de alho como aditivo antioxidante e antibacteriano.

5.5 Avaliação da toxicidade dos extratos da casca de *Allium sativum L.*

5.5.1 Teste de toxicidade sobre *Artemia salina*

A análise de toxicidade dos extratos obtidos da casca do alho sobre *Artemia salina* foi realizada através da contagem dos organismos não sobreviventes em cada concentração testada. O controle positivo submetido apenas à solução salina sintética foi associado a 100% de sobrevivência e todos os extratos analisados apresentaram valores de $CL_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$. Segundo a metodologia adotada (MEYER *et al.*, 1982), são considerados substâncias atóxicas amostras que apresentem CL_{50} superior a $1000 \mu\text{g/mL}$, o

que indica que os extratos em estudo não apresentaram toxicidade perante o microcrustáceo *Artemia salina*.

Os extratos da casca do alho não apresentaram efeito tóxico em relação à *Artemia salina*, diferente do observado em extrato etanólico preparado a partir do bulbo e da folha do alho conforme determinado por Fonseca *et al.* (2019). Handayani *et al.* (2018) avaliando a toxicidade do alho negro, produto resultante da maturação do bulbo do alho em condições controladas, obtiveram valores de DL 50 entre 682.433 e 572.403 ppm, enquanto que o extrato produzido pela imersão de bulbos de alho em álcool 70% apresentou DL50 de 428ppm. O que demonstra que extratos obtidos dos prófilos da casca de *Allium sativum L.* apresentam menor toxicidade em comparação a extratos obtidos do bulbo.

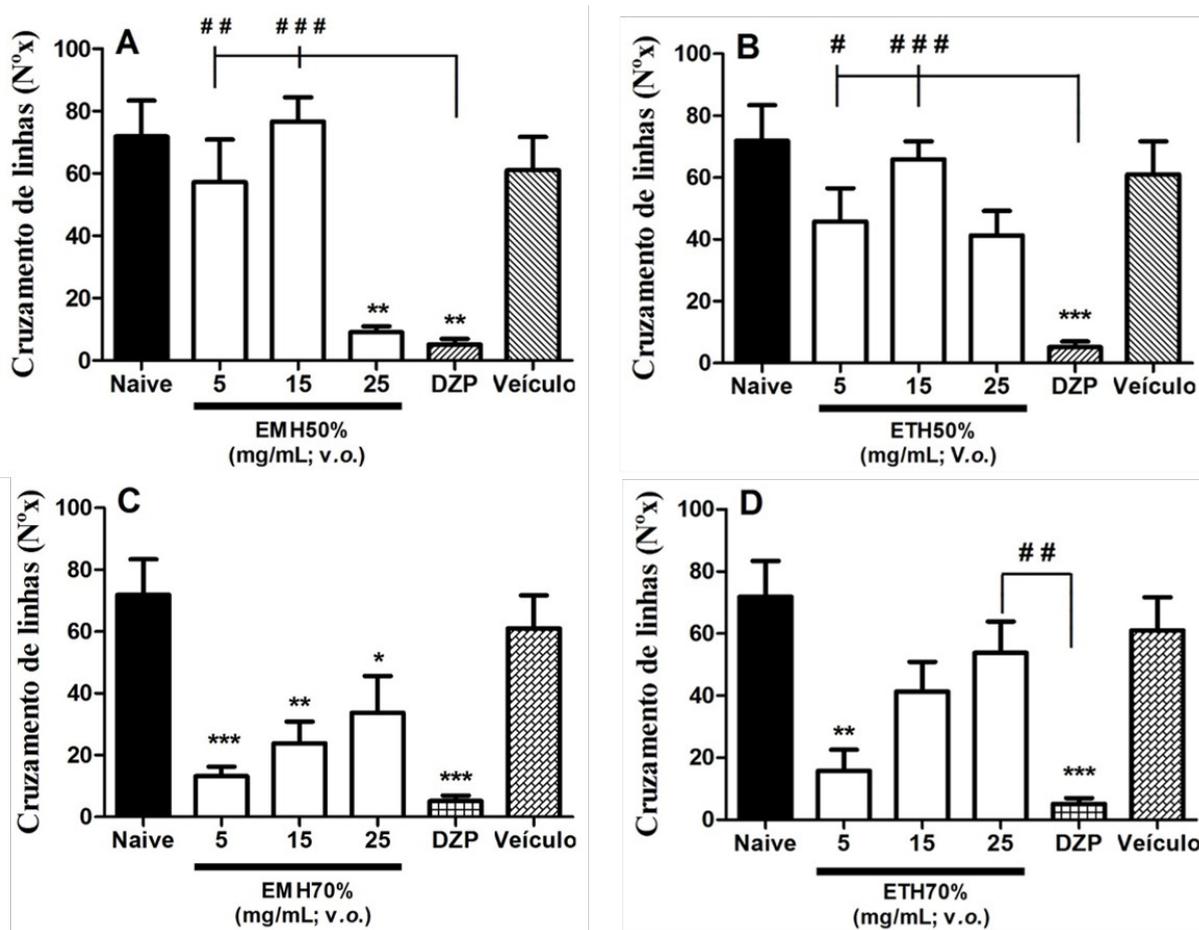
Deste modo, a avaliação preliminar da toxicidade dos extratos da casca de *Allium sativum L.* sobre o microcrustáceo *Artemia salina* indica uma baixa toxicidade ($CL_{50} > 1000 \mu\text{g}/\text{mL}$), o que possibilita e estimula a realização de futuros trabalhos visando à aplicação destes extratos em produtos alimentícios.

5.5.2 Avaliação da toxicidade sobre *Danio rerio*

No teste de toxicidade aguda, após 96 horas da aplicação dos extratos por via oral não foi detectada mortalidade em todos os extratos nas concentrações testadas ($CL_{50} > 25000 \mu\text{g}/\text{mL}$), segundo Simões e de Almeida (2015) e Batista *et al.* (2018) estes resultados indicam uma ausência de toxicidade e possibilitam a utilização destes extrato como fitoterápico.

A Figura 6 apresenta os efeitos de extratos hidroalcoólicos de casca de alho na motilidade do zebrafish. Avaliando a concentração com potencial antibactericida (5 mg/mL), apenas EMH50% (A) e ETH50% (B) não apresentaram efeito sedativo, pois não diminuíram a atividade locomotora dos animais.

Figura 6 - Efeito da toxicidade de EMH50% (A), ETH50% (B), EMH70% (C) e ETH70% (D) na motilidade de *Danio rerio* adultos, expresso através do número de cruzamento de linhas. Os resultados são expressos como valores médios com erro padrão da média (n=6/grupo). DZP - Diazepam (5 mg/mL). Veículo (água destilada). v.o – via oral. As diferenças foram analisadas com análise de variância – ANOVA, seguido pelo teste de Tukey [*p<0.05; **p<0.01; ***p< 0.001 vs naive ou veículo (controle); #p<0.05; # #p<0.01; # # #p<0.001 vs DZP].



Fonte: Elaborado pela autora.

Podemos observar que no extrato ETH50% (Fig. 6B) não houve diferença entre os tratamentos, enquanto que o extrato EMH50% representado na Figura 6A, apenas a concentração de 25 mg/mL diferiu do grupo controle, com redução no número de cruzamento de linhas, obtendo um resultado semelhante ao controle sedativo (diazepam), sugerindo que altas concentrações destes extratos podem reduzir a atividade locomotora destes animais.

A diminuição da atividade locomotora em zebrafish adulto causada pelos extratos obtidos com 70% de etanol sugere um possível efeito sedativo como os benzodiazepínicos (drogas ansiolíticas), que diminuem a atividade locomotora em *D. rerio* (BENNEH *et al.*, 2017; LEMOS *et al.*, 2021), por esta razão, o Diazepam também foi testado como controle sedativo. Os grupos 5 mg/mL EMH70% (Fig. 6C) e ETH70% (Fig. 6D) apresentaram resultados significativamente melhores quando comparados ao Diazepam (500 mg/Kg). Ainda assim, esses resultados indicam a presença de substâncias capazes de interferir na atividade locomotora desses animais, mesmo em baixas concentrações, impossibilitando a utilização de maiores concentrações desses extratos.

Apesar de ser uma espécie largamente consumida, já foram relatados efeitos

tóxicos de extratos e derivados do alho em doses altas. A DL50 para extratos de alho costuma variar entre 0,5 mL/Kg a 30 mL/Kg administrados por várias vias em ratos e camundongos, deste modo a segurança dos seus ingredientes ativos do alho quando usados em concentrações mais elevadas, deve ser analisada (DE GREEF *et al.*, 2021; DUTTA *et al.*, 2021). Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que as substâncias presentes no bulbo que são capazes de apresentar efeitos tóxicos, possivelmente também estão presentes na casca do alho necessitando de mais pesquisas nesta área a fim de identificar as substâncias responsáveis por este efeito tóxico e neutralizá-las.

6. CONCLUSÃO

Os extratos hidroalcoólicos da casca do alho obtiveram maior teor de compostos fenólicos e, também de taninos, flavonoides e antocianinas em relação aos extratos aquosos. A técnica de maceração foi mais eficiente para a extração destes compostos que a técnica de turbolização e ao comparar o percentual de etanol utilizado os extratos com 70% de etanol apresentaram teor de compostos bioativos superiores. O resultado de compostos bioativos apresentou correlação direta ao resultado do potencial antioxidante destes extratos, em que o extrato EMH70%, seguido por EMH50% apresentaram resultados significativamente superiores ao demais. Os extratos aquosos obtidos da casca de *Allium sativum L.* não apresentaram ação antimicrobiana, enquanto os extratos hidroalcoólicos apresentaram efeito bactericida frente aos microorganismos gram positivos *Staphylococcus aureus* (ATCC 27664) e *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115), mesmo em concentrações baixas (2 a 8 mg/mL). Os extratos hidroalcoólicos obtidos da casca de *Allium sativum L.* não apresentaram efeito tóxico tanto em relação à *Artemia salina*, como zebrafish (*Danio rerio*), no entanto Teste de Campo Aberto ensaio com demonstrou a presença de substâncias capazes de alterar a atividade locomotora de zebrafish adultos nos extratos obtidos com 70% de etanol (EMH70% e ETH70%). Deste modo, o extrato obtido através da turbolização das cascas de *Allium sativum L.* utilizando etanol 50% como solvente (ETH50%) demonstrou ausência de toxicidade, aliada a um alto teor de compostos bioativos e efeito antibacteriano observado em baixas concentrações, sendo o extrato mais recomendado para as utilizações futuras em matrizes alimentares.

REFERÊNCIAS

AHMAD, F.; RICHARDSON, M. K. Exploratory behaviour in the open field test adapted for larval zebrafish: impact of environmental complexity. **Behavioural Processes**, v. 92, p.88-98, 2013.

ALBUQUERQUE, R. B.; HELENO, A. S.; OLIVEIRA, P. M. B. P.; BARROS, L.; FERREIRA, R. I. C. F. Phenolic compounds: current industrial applications, limitations and future challenges. **Food & Function**, v. 12, n. 1, p. 14–29, 2021.

ALMEIDA, M.; BONAVENTURA, C.; LIMA, A. D.; AZAR, L. **Alho**. Tecnologia em Gastronomia: Noções de Nutrição, 2006.

ALTEMIMI, A.; LAKHSSASSI N.; BAHARLOUEI A.; WATSON D. G.; LIGHTFOOT D. A. Phytochemicals: Extraction, Isolation, and Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts. **Plants**, v.6, n.42, p. 1-23, 2017.

AMARANTE, C.; MÜLLER, A.; PÓVOA, M.; AMAZONICA, M. D. A. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga. **SciELO Brasil**, 2011.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, p. 1–9, 2007.

ANSARY, J.; FORBES-HERNÁNDEZ, T. Y.; GIL, E.; CIANCIOSI, D., ZHANG, J., ELEXPURU-ZABALETA, M., & BATTINO, M. Potential health benefit of garlic based on human intervention studies: A brief overview. **Antioxidants**, n. 1, 2020.

ANVISA. **RDC 313 de 2019**. Aprova o Fascículo 6 da Parte II da 6ª Edição da Farmacopéia Brasileira. 6 ed. Brasília-DF, 2019.

ARELLANO-AGUIAR, O.; SOLIS-ANGELES, S.; SERRANO-GARCÍA, L.; MORALES- SIERRA, E.; MENDEZ-SERRANO, A.; MONTERO-MONTOYA, R. Use of the zebrafish embryo toxicity test for risk assessment purpose: case study. **Journal of Fisheries Sciences**, v.9, p.52-62, 2015.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists**. (method 952.03) n. 29, p.16-17, 1995.

AZMIR, J.; ZAIDUL, I. S. M.; RAHMAN, M. M.; SHARIF, K. M.; MOHAMED A.; SAHENA, F.; JAHURUL, M. H. A.; GHAFOR, K.; NORULAIN, N.A.N.; OMAR, A. K. M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plants materials: A review. **Journal of food engineering**, v. 117, p. 426-436, 2013.

AZWANIDA, N.N. A. Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. **Medicinal and Aromatic Plants**, v. 4, n. 3, p. 1-6, 2015.

BATIHA, G. E. S.; BESHBIHY, A. M.; WASEF, L. G.; ELEWA, Y. H., A AL-SAGAN,

- A., EL-HACK, A., ... & PRASAD DEVKOTA, H. Chemical constituents and pharmacological activities of garlic (*Allium sativum* L.): A review. **Nutrients**, v. 12, n. 3, p. 872, 2020.
- BATISTA, F.; LIMA, L.; ABRANTE, I. A.; DE ARAÚJO, J.; BATISTA, F.; ABRANTE, I. A.; MAGALHÃES, E. A.; DE LIMA, D. R.; LIMA, M.; DO PRADO, B. S.; MOURA, L.; GUEDES, M.; FERREIRA, M.; DE MENEZES, J.; SANTOS, S.; MENDES, F.; MOREIRA, R. A.; MONTEIRO-MOREIRA, A.; CAMPOS, A. R.; MAGALHÃES, F. Antinociceptive activity of ethanolic extract of *Azadirachta indica* A. Juss (Neem, Meliaceae) fruit through opioid, glutamatergic and acid-sensitive ion pathways in adult zebrafish (*Danio rerio*). **Biomedicine & pharmacotherapy**, v.108, p.408–416, 2018.
- BENELLI, P.; RIEHL, C. A. S.; SMÂNIA, A.; SMÂNIA, E. F. A.; FERREIRA, S. R. S. Bioactive extracts of orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) pomace obtained by SFE and low pressure techniques: Mathematical modeling and extract composition. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, n. 1, p. 132–141, 2010.
- BENNEH, C. K.; BINEY, R. P.; MANTE, P. K.; TANDOH, A.; ADONGO, D. W. Woode, E. *Maerua angolensis* stem bark extract reverses anxiety and related behaviours in zebrafish—Involvement of GABAergic and 5-HT systems. **Elsevier**, v. 207, p. 129-145, 2017.
- BERGAMASCHI, K. B. **Capacidade antioxidante e composição química de resíduos vegetais visando seu aproveitamento**. Dissertação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade de São Paulo, Piracicaba – SP, 2010.
- BICHARA, D.; CALCATERRA, N. B.; ARRANZ, S.; ARMAS, P.; SIMONETTA, S. H. Set-up of an infrared fast behavioral assay using zebrafish (*Danio rerio*) larvae, and its application in compound biotoxicity screening. **Journal of Applied Toxicology**, v. 34, n. 2, p. 214–219, 2014.
- BIN, C.; AL-DHABI, N. A.; ESMAIL, G. A.; AROKIYARAJ, S.; ARASU, M. V. Potential effect of *Allium sativum* bulb for the treatment of biofilm forming clinical pathogens recovered from periodontal and dental caries. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 27, n. 6, p. 1428–1434, 2020.
- BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Introdução à química de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 2003.
- BONA, E. A. M.; PINTO, F. G. S.; FRUET, T. K.; JORGE, T. C. M.; MOURA, A. C. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.81, n.3, p. 218-225, 2014.
- BRANDT, A. L.; CASTILLO, A.; HARRIS, K. B.; KEETON, J. T.; HARDIN, M. D.; TAYLOR, T. M. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by food antimicrobials applied singly and in combination. **Journal of Food Science**, Malden, v. 75, n. 9, p. 557-563, 2010.
- BRANEN, J. K.; DAVIDSON, P. M. Enhancement of nisin, lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 90, p. 63 – 74, 2004.

CABRAL, L. C.; PINTO, V. F.; PATRIARCA, A. Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v.166, p.1-14, 2013.

CALO, J. R.; CRANDALL, P. G.; O'BRYAN, C. A.; RICKE, S. C. Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. **Food Control**, v. 54, p.111-119, 2015.

CHAN, C. H.; YUSOFF, R.; NGOH, G. C.; KUNG, F. W. L. Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v.1218, p. 6213-6225, 2011.

CHEMISTS, A. OF O. A.; HORWITZ, W. Official methods of analysis, 1975.

CHHOUK, K.; UEMORI, C.; WAHYUDIONO, KANDA, H.; GOTO, M. Extraction of phenolic compounds and antioxidant activity from garlic husk using carbon dioxide expanded ethanol. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 117, p. 113–119, 2017. Elsevier B.V.

CHOWDHURY, A.; BHOWAL, A.; DATTA, S. Equilibrium, Thermodynamic and Kinetic Studies for Removal of Copper(II) from Aqueous Solution by Onion and Garlic Skin, **Water**.v.4, p. 37–51, 2012.

CLSI. Padrões de desempenho para testes de suscetibilidade antimicrobiana CLSI Suplemento M100S. **Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais**, Wayne, 26^a ed, 2016.

COLLYMORE, C.; RASMUSSEN, S.; TOLWANI, R. J. Gavaging adult zebrafish. **Journal of Visualized Experiments**, v.78, p.1-5, 2013.

COWAN, M. M. Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 564–582, 1999.

DE GREEF, D.; BARTON, E. M.; SANDBERG, E. N.; CROLEY, C. R.; PUMAROL, J.; WONG, T. L., ... & BISHAYEE, A. Anticancer potential of garlic and its bioactive constituents: A systematic and comprehensive review. **Seminars in Cancer Biology**, v. 73, p. 219–264, 2021. Academic Press.

DUTTA, A.; DAHIYA, A.; PRAKASH, A.; AGRAWALA, P. K. Acute toxicity of diallyl sulfide derived from *Allium sativum* (garlic) in mice and its possible mechanisms. **Phytomedicine Plus**, v. 1, n. 3, p. 100084, 2021.

EKŞI, G.; GENÇLER ÖZKAN, A. M.; KOYUNCU, M. Garlic and onions: An eastern tale. **Journal of Ethnopharmacology**, 10. May, 2020.

FACCIOL, A.; GERLAI, R. Zebrafish Shoaling, Its Behavioral and Neurobiological Mechanisms, and Its Alteration by Embryonic Alcohol Exposure: A Review. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 14, 2020.

FAI, A. E. C.; FIGUEIREDO, E. A. T.; VERDIN, S. E. F.; PINHEIRO, N. M. S.; BRAGA, A. R. C.; STAMFORD, T. L. M. *Salmonella sp* e *Listeria monocytogenes* em presunto suíno comercializado em supermercados de Fortaleza (CE, Brasil): fator de risco para a saúde

pública. **Ciência e Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v.16, n.2, p.657-662, 2011.

FERRARI, R. A.; COLUSSI, F.; AYUB, R. A. Caracterização de Subprodutos da Industrialização do Maracujá - Aproveitamento das Sementes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.26, n.1, p.101-102, 2004.

FERREIRA, M. J. G. **Atividade antimicrobiana de extratos aquosos de plantas medicinais sobre bactérias causadoras de doenças de origem alimentar**. Dissertação, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

FERREIRA, M. J. G.; DIAS, F. G. B.; SANTOS, S. M.; MENEZES, R. C. S.; SILVA, L. M. R.; FIGUEIREDO, E. A. T. Avaliação de plantas medicinais como potenciais aditivos antimicrobianos alimentares. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 5, 2020.

FERREIRA, M. K. A.; DA SILVA, A. W.; SILVA, F. C. O.; NETO, A. E. V.; CAMPOS, A. R.; SANTOS, S. A. R.; & SANTOS, H. S. Anxiolytic-like effect of chalcone N-{4'[(2E)-3-(3-nitrophenyl)-1-(phenyl)prop-2-en-1-one]} acetamide on adult zebrafish (*Danio rerio*): Involvement of the 5-HT system. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 526, n. 2, p. 505–511, 2020.

FONSECA, A.; QUEFI, B.; ALCÓCER, J.; PINTO, O.; CARVALHO, R. Análise fitoquímica e atividades biológicas do alho. **Enciclopédia Biosfera**, v. 16, n. 29, p. 141–156, 2019.

FONSECA, G. M.; PASSOS, T. C.; NINAHUAMAN, M. F. M .L.; CAROCI, A. S.; COSTA, L. S. Avaliação da atividade antimicrobiana do alho (*Allium sativum* Liliaceae) e de seu extrato aquoso. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.16, n.3, p.679-684, 2014.

FRANCIS, F. J. Analysis of anthocyanins. In: MARKAKIS, P.(Ed). **Anthocyanins as food colors**. Academic Press, New York, p. 181-207, 1982.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2002.

FRATIANNI, F.; OMBRA, M. N.; COZZOLINO, A.; RICCARDI, R.; SPIGNO, P.; TREMONTE, P.; COPPOLA, R.; NAZZARO, F. Phenolic constituents, antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activities of different endemic Italian varieties of garlic (*Allium sativum* L.). **Journal of Functional Foods**. v. 21, p.240–248, 2016.

GABER, N. B.; EL-DAHY, S. I.; SHALABY, E. A. Comparison of ABTS, DPPH, permanganate, and methylene blue assays for determining antioxidant potential of successive extracts from pomegranate and guava residues. **Biomass Conversion and Biorefinery**, 2021. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. Acesso em: 28/10/2021.

GARCIA-VAQUERO, M.; UMMAT, V.; TIWARI, B.; RAJAURIA, G. Exploring Ultrasound, Microwave and Ultrasound–Microwave Assisted Extraction Technologies to Increase the Extraction of Bioactive Compounds and Antioxidants from Brown Macroalgae. **Marine Drugs** 2020, Vol. 18, Page 172, v. 18, n. 3, p. 172, 2020.

GIL-CHÁVEZ, G. J.; VILLA, J. A.; AYALA-ZAVALA, J. F.; HEREDIA, J. B.; SEPULVEDA, D., YAHIA, E. M.; GONZALEZ-AGUILAR, G. A. Technologies for extraction and production of

- bioactive compounds to be used as nutraceuticals and food ingredients: an overview. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. 1, p. 5–23, 2013.
- GYAWALI, R.; IBRAHIM, S. A. Natural products as antimicrobial agents. **Food Control**, v.46, p. 412- 429, 2014.
- HAMEED B. H.; AHMAD A. A. Batch adsorption of methylene blue from aqueous solution by garlic peel, an agricultural waste biomass. **Journal of Hazardous Materials**, v.164, p.870–875, 2009.
- HANDAYANI, S. N.; BAWONO, L. C.; AYU, D. P.; PRATIWI, H. N. Isolasi Senyawa Polifenol Black garlic Dan Uji Toksisitasnya Terhadap Larva Udang (*Artemia salina* Leach). **JURNAL ILMU KEFARMASIAN INDONESIA**, v. 16, n. 2, p. 145–149, 2018.
- HAYAT, S.; AHMAD, H.; ALI, M., REN, K.; CHENG, Z. Aqueous garlic extract stimulates growth and antioxidant enzymes activity of tomato (*Solanum lycopersicum*). **Scientia Horticulturae** ,v.240, p.139–146, 2018.
- HOWE, K.; CLARK, M.; TORROJA, C.; TORRANCE, J.; BERTHELOT, C.; MUFFATO, M.; COLLINS, J. E.; HUMPHRAY, S.; MCLAREN, K.; MATTHEWS, L.; MCLAREN, S.; SEALY, I.; CACCAMO, M.; CHURCHER, C.; SCOTT, C.; BARRETT, J. C.; KOCH, R.; AL., E. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 498–503, 2013.
- HUANG, Y.; ZHANG, J.; HAN, X.; HUANG, T. The use of zebrafish (*Danio rerio*) behavioral responses in identifying sublethal exposures to deltamethrin. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v.11, n. 4 p.3650-3660, 2014.
- ICHIKAWA, M.; RYU, K.; YOSHIDA, J.; IDE, N.; KODERA, Y.; SASAOKA, T.; ROSEN, R.T. Identification of six phenylpropanoids from garlic skin as major antioxidants, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 7313–7317, 2003.
- IFESAN, B. O. T.; FADIPEL, E. A.; IFESAN B. T. Investigation of Antioxidant and Antimicrobial Properties of Garlic Peel Extract (*Allium sativum*) and Its Use as Natural Food Additive in Cooked Beef. **Journal of Scientific Research & Reports**, v.3, n.5: p. 711-721, 2014.
- JAKOPIC, J.; STAMPAR, F.; VEBERIC, R. The influence of exposure to light on the phenolic content of 'Fuji' apple. **Scientia Horticulturae**, v. 123, n. 2, p. 234–239, 2009. Elsevier.
- JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- KAI, H.; JIU-GANG, S.; HONG-MIN, Z.; INOUE, K. Removal of fluoride from aqueous solution onto Zr-loaded garlic peel (Zr-GP) particles. **Journal of Central South University of Technology**, v.18, p.1448–1453. 2011.
- KALLEL, F.; BETTAIEB, F.; KHIARI, R.; GARCÍA, A.; BRAS, J.; CHAABOUNI, S. E. Isolation and structural characterization of cellulose nanocrystals extracted from garlic straw residues. **Industrial Crops and Products**, v. 87, p.287–296, 2016.

KALLEL, F.; DRISS, D.; CHAARI, F.; BELGHITH, L.; BOUAZIZ, F. Garlic (*Allium ativum* L.) husk wasted as a potential source of phenolic compounds: influence of extracting solvents on its antimicrobial and antioxidant activity. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 34–41, 2014.

KALLEL, F.; ELLOUZ CHAABOUNI, S. Perspective of garlic processing wastes as low-cost substrates for production of high-added value products: A review. **Environmental Progress and Sustainable Energy**, 1. Nov. 2017.

KIM, Y. J.; JIN, S. K.; YANG, H. S. Effect of dietary garlic bulb and husk on the physicochemical properties of chicken meat. **Poultry Science**, v. 88, p.398–405, 2009.

LANDGRAF, M. **Novos patógenos de interesse em alimentos**. Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 31, n. 1, p. 5-7, 1997.

LARRAURI, J. A.; RUPÉREZ, P.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, p.1390-1393, 1997.

LEMOS, C. G.; VALE, J. P. C.; FERREIRA, M. K. A.; SILVA, A. W.; MENEZES, J. E. S. A.; & DOS SANTOS, H. S. Avaliação da atividade locomotora e teste de toxicidade do eugenol utilizando zebrafish (*danio rerio*) adulto. **Ambiente: Gestão e Desenvolvimento**, v. 1, n. 1, 2021.

LEONÊZ, A. C. **Alho: Alimento e saúde**. Curso de Especialização em Gastronomia e Saúde. Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

LI, R.; DU, W.; YANG, J.; LIU, Z.; YOUSEF, A. Control of *Listeria monocytogenes* biofilm by paenibacterian, a natural antimicrobial lipopeptide. **Food Control**, v. 84, p. 529-535, 2018.

LI, Y.; GUO, C.; YANG, J.; WEI, J.; XU, J.; & CHENG, S. Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. **Food Chemistry**, v. 96, n. 2, p. 254– 260, 2006.

LIMA, C. B. **Potencial biológico dos extratos obtidos da folha do cumaru (*Amburana cearensis* A.C. Smith) sobre bactérias transmitidas por alimentos**, Dissertação, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.

LIU, W.; LIU, Y.; TAO, Y.; YU, Y. Comparative study of adsorption of Pb(II) on native garlic peel and mercerized garlic peel, **Environmental Science and Pollution Research**, v.21, p. 2054–2063, 2014.

MAGALHÃES, F. E. A.; DE SOUSA, C. A. P. B.; SANTOS, S. A. A. R.; MENEZES, R. B.; BATISTA, F. L. A.; ABREU, A. O.; DE OLIVEIRA, M. V.; MOURA, L. F.W.G.; RAPOSO, R. D. S.; CAMPOS, A. R Adult zebrafish: an alternative behavioral model of formalina-induced nociception. **Zebrafish**, v. 4, p.422-429, 2017.

MARTINS, A. C. R.; COSTA, J. K. N.; HERBERT, A.; FARIAS, F. R. S.; REZENDE, M.; JUNIOR, V. A. K.; & DE GEUS, J. L. Avaliação da toxicidade das tinturas de aroeira e de romã através do bioensaio com *Artemia salina*. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 3, 2021.

- MERIGA, B.; MOPURI, R.; MURALIKRISHNA, T. **Insecticidal, antimicrobial and antioxidant activities of bulb extracts of *Allium sativum*** *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2012.
- MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Médica*, v. 45, n. 5, p. 31-34, 1982.
- MICHIELS, J. A.; KEVERS, C.; PINCEMAIL, J.; DEFRAIGNE, J. O.; DOMMES, J. Extraction conditions can greatly influence antioxidant capacity assays in plant food matrices. *Food Chemistry*, v. 130, n. 4, p. 986–993, 2012.
- MIMS, C. A.; PLAYFAIR, J. H. L.; ROITT, I. M.; WAKELIN, D.; WILLIAMS, R. *Microbiologia Médica*. 1. ed. São Paulo: Manole, 1999.
- MOURA, K. A. **Efeito do extrato aquoso de alho sobre a qualidade microbiológica de frangos resfriados**, Tese, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.
- NAVARRO, D. F. **Estudo químico, biológico e farmacológico das espécies *Allamanda blanchetti* e *Allamanda schottii* na obtenção de moléculas bioativas de potencial terapêutico**. Dissertação, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.
- NAZARI, M.; GHANBARZADEH, B.; KAFIL, H. S.; ZEINALI, M.; HAMISHEHKARF, H. Garlic essential oil nanophytosomes as a natural food preservative: Its application in yogurt as food model. *Colloid and Interface Science Communications*, v.30 , 2019.
- NGAHA NJILA, M. I.; MAHDI, E.; MASSOMA LEMBE, D.; NDE, Z.; NYONSEU, D. **Review on Extraction and Isolation of Plant Secondary Metabolites**. In: 7th Int'l Conference on Agricultural, Chemical, Biological and Environmental Sciences, 2017, Kuala Lumpur, Anais, p. 67., 2017.
- NODA, Y.; ASADA, C.; SASAKI, C.; NAKAMURA, Y. Effects of Hydrothermal Methods such as Steam Explosion and Microwave Irradiation on Extraction of Water Soluble Antioxidant Materials from Garlic Husk. *Waste and Biomass Valorization*, v. 10, n. 11, p. 3397–3402, 2019.
- NUNES, B. S.; CARVALHO, F. D.; GUILHERMINO, L. M.; VAN STAPPEN, G. Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. *Environmental Pollution*, v. 144, n. 2, p. 453–462, 2006.
- OECD **Guideline for testing of chemicals. Fish, acute toxicity test**, 1992.
<http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948241.pdf>. Acesso em: 10/11/2019.
- OLIVEIRA, V. B.; MEZZOMO, T. R.; MORAES, E. F. Conhecimento e Uso de Plantas Medicinais por Usuários de Unidades Básicas de Saúde na Região de Colombo, PR. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*, v.22, n.1, p.57-64, 2018.
- PEREIRA, M. L.; ROCOURT, J. *Listeria monocytogenes*: Uma revisão sobre aspectos taxonômicos, importância médica e em alimentos. *Revista Higiene Alimentar*, Mirandópolis, v.7, n.26, p.5-12. 1993.

PEREIRA, S. S. A. A.; PÊGAS, M. M.; FERNÁNDEZ, T.L.; MAGALHÃES, M.; SCHÖNTAG, T. G.; LAGO, D. C.; SENNA, L. F.; D'ELIA, E. Inhibitory action of aqueous garlic peel extract on the corrosion of carbon steel in HCl solution. **Corrosion Science**, v.65, p.360–366, 2012.

PINILLA, C. M. B.; BRANDELLI, A. Antimicrobial activity of nanoliposomes co-encapsulating nisin and garlic extract against Gram-positive and Gram-negative bacteria in milk. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 36, p. 287–293, 2016.

PISOSCHI, A. M.; Pop, A.; Georgescu, C.; Turcuş, V.; Olah, N. K.; Mathe, E. An overview of natural antimicrobials role in food. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 922-935, 2018.

RASTOGI, L.; ARUNACHALAM, J. Sunlight based irradiation strategy for rapid green synthesis of highly stable silver nanoparticles using aqueous garlic (*Allium sativum*) extract and their antibacterial potential. **Materials Chemistry and Physics**, v. 129, n. 1–2, p. 558–563, 2011.

RIBEIRO, L. DO P. **Biosprospecção de extratos vegetais e sua interação com protetores de grãos no controle de *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae)**. Piracicaba: Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, 2011.

ROBARDS, K.; LI, X.; ANTOLOVICH, M.; & BOYD, S. Characterisation of citrus by chromatographic analysis of flavonoids. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.75, n. 1, p. 87-101, 1997.

RODRIGUEZ, A. G.; TEIXEIRA, O. M.; SALLES, F. G.; VITAL, J. P.; & PEIXOTO, D. S. Bioensaio dom *Artemia Salina* para Detecção de Toxinas em Alimentos Vegetais. *Revista EVS-Revista de Ciências Ambientais e Saúde*, v. 36, n. 4, p. 795-808, 2009.

RUFINO, M. D. S. M.; ALVES, R. E.; DE BRITO, E. S.; DE MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. D. G.; PÉREZ-JIMENEZ, J.; & SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Embrapa Agroindústria Tropical - Comunicado Técnico**, 2007.

SASIDHARAN, S.; CHEN, Y.; SARAVANAN, D.; SUNDRAM, K. M.; LATHA, L. Y. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants extracts. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2011.

SELVAMANI, V.; RAVIKUMARB, R.; SURYANARAYANANA, V.; VELAYUTHAMA, D.; GOPUKUMARB, S. Garlic peel derived high capacity hierarchical N-doped porous carbon anode for sodium/lithium ion cell. **Electrochimica Acta**, v.190, p.337–345, 2016.

SHARAPIN, N. **Fundamentos de Tecnologia de Produtos Fitoterápicos**. Santafé de Bogotá: **Convênio Andrés Belo**, 2000.

SILVA, A. S.; ARAGON, C. C.; SANTANA, E. H. W.; DESTRO, M. T.; COSTA, M. R.; ALEGRO, L. C. A. *Listeria monocytogenes* em Leite e Produtos Lácteos no Brasil: Uma Revisão. **Ciências biológicas e da Saúde**, Londrina, v.13, n.1, p.59-67, 2011.

SILVA, C. S.; NUNES, P. O.; MESCOUTO, C. S. T.; MÜLLER, R. C. S.; PALHETA, D. C.; FERNADES, K. G. Avaliação do uso da casca do fruto e das folhas de *Caesalpinia ferrea* Martius como suplemento nutricional de Fe, Mn e Zn. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 3, 2010.

SILVA, M. B.; ROSA, M. B.; BRASILEIRO, B. G.; ALMEIDA, V.; SILVA, C. C. A. **Desenvolvimento de produtos à base de extratos de plantas para o controle de doenças de plantas**. In: VENEZON, M.; PAULA J. R. T. J.; PALLINI, A. (Eds.). Controle alternativo de pragas e doenças. Viçosa: EPAMIG/CTZM, p.221-246, 2005

SILVER, L.; BOSTIAN, K. Screening of natural products for antimicrobial agents. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases** 1990 9:7, v. 9, n. 7, p. 455–461, 1990.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 5.ed. Porto Alegre / Florianópolis: Editora da Universidade, p. 221-224 , 2003.

SIMÕES, R. C.; ALMEIDA, S. S. M. S. Estudo fitoquímico de *bauhinia forficata* (fabaceae). **Biota Amazônia**, v. 5, n. 1, p. 27-31, 2015.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152–178, 1999.

SOUSA, A. Z. B.; ABRANTES, M. R.; SAKAMOTO, S. M.; SILVA, J. B. A.; LIMA, P. O.; LIMA, R. N.; ROCHA, M. O. C.; PASSOS, Y. D. B. Aspectos físico-químicos e microbiológicos do queijo tipo coalho comercializado em estados do nordeste do Brasil. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 81, n. 1, p. 30- 35, 2014.

SOUZA, C. N.; Almeida, A. C.; Xavier, M. T. R.; Costa, J. P. R.; Silva, L. M. V.; Martins, E. R. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais do cerrado mineiro frente a bactérias isoladas de ovinos com mastite. **Revista Unimontes Científica**, v.19, n. 2, p. 51-61, 2017.

SOUZA, L. S. S. **Extratos aquosos de alho (*Allium sativum* L.) e sisal (*Agave sisalana* Perrine) no controle de *Aspergillus niger* e da podridão vermelha do sisal**. Dissertação, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das almas, 2010.

STICHER, O. Natural Product Isolation. **Natural Product Reports**, London, v. 25, p. 517-557, 2007.

TAJKARIMI, M. M.; IBRAHIM, S. A.; CLIVER, D. O. Antimicrobial herb and spice compounds in food. **Food Control**, v.21, p. 1199-1218, 2010.

TIAN, F.; LI, B.; JI, B.; YANG, J.; ZHANG, G.; CHEN, Y.; & LUO, Y. Antioxidant and antimicrobial activities of consecutive extracts from *Galla chinensis*:The polarity affects the bioactivities. **Food Chemistry**, v. 113, n. 1, p. 173–179, 2009.

TRIGUEIRO, N. S. D. S.; CANEDO, A.; BRAGA, D. L. D. S.; LUCHIARI, A. C.; ROCHA, T. L. Zebrafish as an Emerging Model System in the Global South: Two Decades of Research

in Brazil. **Zebrafish**, v. 17, n. 6, p. 412–425, 2020.

TRIO, P. Z.; YOU, S.; HE, X.; HE, J.; SAKAO, K.; HOU, D. X. Chemopreventive functions and molecular mechanisms of garlic organosulfur compounds. **Food & Function**, v. 5, n. 5, p. 833–44, 2014.

VIJAYAKUMAR, S.; MALAIKOZHUNDANA, B.; SARAVANAKUMAR, K.; DURÁN-LARAC, E. F.; WANG, M.; VASEEHARANA, B. Garlic clove extract assisted silver nanoparticle – Antibacterial, antibiofilm, antihelminthic, anti-inflammatory, anticancer and ecotoxicity assessment. **Journal of Photochemistry & Photobiology**, v. 198, 2019.

WEBER, D.; HOFFMANN, J. F.; BARRETO, C. F.; MADRUGA, N. A.; CRIZEL, R. L.; NACHTIGAL, J. C.; ... & MALGARIM, M. B. COMPOSTOS BIOATIVOS NAS FOLHAS DE GENÓTIPOS DE MARACUJAZEIROS. **Revista Científica Rural, Bagé-RS**, v. 23, p. 2021.

WOLLENWEBER, E.; MANN, K.; ARRIAGA-GINER, F.; PHYTOCHEMISTRY, J. R. 1993, UNDEFINED. Exudate flavonoids from two Australian Asteraceae, *Bracteantha viscosa* and *Cassinia quinquefaria*. **Elsevier**.

ZŁOTEK, U.; MIKULSKA, S.; NAGAJEK, M.; ŚWIECA, M. The effect of different solvents and number of extraction steps on the polyphenol content and antioxidant capacity of basil leaves (*Ocimum basilicum* L.) extracts. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, n. 5, p. 628–633, 2016.