

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIA E TECNOLOGIA DOS ALIMENTOS

Vanessa Bordin Viera

**COMPOSTOS BIOATIVOS, ATIVIDADE ANTOXIDANTE E
ANTIMICROBIANA NA CASCA DE CEBOLA ROXA (*Allium cepa* L.)
SUBMETIDOS A DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO**

Santa Maria, RS
2016

Vanessa Bordin Viera

**COMPOSTOS BIOATIVOS, ATIVIDADE ANTOXIDANTE E ANTIMICROBIANA NA
CASCA DE CEBOLA ROXA (*Allium cepa* L.) SUBMETIDOS A DIFERENTES
MÉTODOS DE EXTRAÇÃO**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Ciência e Tecnologia dos Alimentos.**

Orientador: Prof. Dr. Ernesto Hashime Kubota

Santa Maria, RS
2016

© 2016

Todos os direitos autorais reservados a Vanessa Bordin Viera. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

Vanessa Bordin Viera

**COMPOSTOS BIOATIVOS, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA NA
CASCA DE CEBOLA ROXA (*Allium cepa* L.) SUBMETIDOS A DIFERENTES
MÉTODOS DE EXTRAÇÃO**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Ciência e Tecnologia dos Alimentos.**

Aprovado em 11 de julho de 2016:

Ernesto Hashime Kubota, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Aline de Oliveira Fogaça, Dr^a. (UNIFRA)

Silvana Maria Michelin Bertagnolli, Dr^a. (UNIFRA)

Claudia Severo da Rosa, Dr^a. (UFSM)

Paulo Cezar Bastianello Campagnol, Dr. (UFSM)

Santa Maria, RS
2016.

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese de doutorado aos meus queridos pais Cedinei Antonio Viera e Maria de Lourdes Bordin Viera que me ensinaram os mais valiosos valores da vida. Ao grande amor da minha vida, Bernardo Bolson pelo apoio incondicional em todos os momentos e por ter feito do meu sonho o nosso sonho.

AGRADECIMENTOS

À *Deus e a Mãe, Rainha e Vencedora Três Vezes Admirável de Schoenstatt* por me dar forças diariamente para continuar a trilhar o caminho que sempre sonhei. Sem esta força divina nenhuma conquista seria possível.

À *minha família*, aos meus pais *Cedinei Viera e Lourdes Viera* que são exemplos de honestidade e humildade, que sempre me encorajaram a seguir em frente nos momentos mais difíceis e a lutar pelos meus sonhos. Obrigada por compreender a minha ausência em vários dias das mães, pais e aniversários ao longo desses quatro anos. Por me dar todo o amor, carinho e por priorizar o acesso à minha educação mesmo diante das dificuldades. As minhas irmãs *Andréia e Géssica* e *cunhados* pela confiança que sempre depositaram no meu trabalho, pelo apoio e por sempre desejarem o melhor para mim. Especialmente aos meus sobrinhos *Sergio Luis e Érica* que são anjos na minha vida e que me fazem sorrir diariamente. *Família*, amo vocês eternamente, vocês são minha fortaleza!

Agradeço, especialmente, a uma pessoa que entrou na minha vida, e possui um lugar muito especial dentro do meu coração, meu melhor amigo e companheiro de todas as horas, meu namorado *Bernardo Bolson*. Amor, obrigada por ousar em sonhar junto comigo e acreditar neste momento. Não encontro palavras para te agradecer, simplesmente tenho muita gratidão. Muito obrigada, te amo!

Meus agradecimentos à minha sogra *Catarina*, cunhados *Pâmela e Frantiesco*, por me acolherer em sua família, incentivar na minha carreira profissional, pelo carinho, amizade e respeito que estabelecemos ao longo desta caminhada.

Ao meu orientador, *Prof Dr. Ernesto Kubota* principalmente pela sua paciência, sua orientação e aos ensinamentos ao longo destes anos. Obrigada por acreditar no meu potencial e pela oportunidade.

Aos professores membros da banca *Dra. Claudia Severo, Dra. Aline Fogaça, Dra. Silvana Bertagnolli, Dra. Luisa Hecktheuer, Dra. Leadir Fries e Dr. Paulo Campagnol e demais professores da Pós-Graduação* pelas valiosas considerações e sugestões essenciais para esta tese.

À minha querida colega de doutorado e amiga *Natiéli Piovesan*, que considero como minha irmã, que sempre esteve ao meu lado, torcendo e apoiando, que juntas compartilhamos de muitas angústias, alegrias e histórias de muito sucesso. Amiga, meus mais sinceros

agradecimentos, por me ajudar a conquistar e a realizar este grande sonho. Tenho muito orgulho de ser sua amiga, hoje e sempre!

Agradeço em especial ao professor *Dr. Renius Mello* pela realização da estatística desta tese, pela ajuda na discussão e correção de artigos.

Aos meus *colegas de doutorado* por ter dividido da amizade e conhecimento. Agradeço a todos que contribuíram na execução desta tese.

Agradeço às alunas estagiárias *Ana Laura Stiebe e Déborah Flores* pela ajuda no laboratório e pelo comprometimento com o trabalho.

Aos funcionários *Marialene, Magé, Rosângela, Andressa e Liana, em especial ao Carlos e a Marta*, pelo auxílio, chimarrão e pelas boas conversas.

Ao Laboratório de Química Industrial e Ambiental do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria, RS pelo empréstimo das micro-ondas focalizada e ultrassom para o desenvolvimento desta pesquisa.

A *CAPES/FAPERGS* pela bolsa de doutorado para a execução deste trabalho.

RESUMO

COMPOSTOS BIOATIVOS, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA NA CASCA DE CEBOLA ROXA (*Allium cepa* L.) SUBMETIDOS A DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

AUTORA: Vanessa Bordin Viera
ORIENTADOR: Ernesto Hashime Kubota

Este trabalho teve como objetivo avaliar o emprego de diferentes métodos (micro-ondas focalizada, ultrassom e convencional por agitação) variando parâmetros como concentração de solvente, tempo, temperatura, potência e pulsos na extração de compostos bioativos da casca de cebola roxa a fim de obter um extrato com alto teor de fenólicos totais, elevada capacidade antioxidante, atividade antibacteriana e antifúngica. Foi determinado o teor de fenólicos totais, flavonoides totais e antocianinas totais dos extratos obtidos, além da capacidade antioxidante *in vitro* por quatro métodos distintos e atividade antibacteriana. Os extratos obtidos através da extração convencional por agitação apresentaram maior teor de fenólicos totais, flavonoides e antocianinas totais quando extraídos com concentração maior do solvente (80%). Com relação ao tempo, verificou-se que o menor tempo de extração, (30 minutos) favoreceu a extração de compostos com maior atividade antioxidante pelo método DPPH e menor concentração inibitória (IC50) e com o maior tempo (240 minutos) obteve-se extratos com maiores atividades antioxidantes pelo método β -caroteno e ABTS. Os resultados encontrados para a extração através das micro-ondas focalizadas, de modo geral, indicaram que as maiores concentrações de solvente (60 e 80%) foram mais eficazes na extração de compostos bioativos e conseqüentemente para obtenção de extratos com maior capacidade antioxidante. Em relação à temperatura de extração, verificou-se que os extratos com maiores teores de compostos fenólicos totais e flavonoides foram obtidos a 70°C. No entanto, o teor de antocianinas totais, atividades antioxidante pelos métodos DPPH e FRAP dos extratos não foram influenciadas pela temperatura de extração. A utilização do ultrassom na extração de compostos bioativos da casca de cebola roxa apontou que a extração de flavonoides totais, antocianinas totais, atividade antioxidante (FRAP e β -caroteno) foram eficientes em potência 130 W, modo pulsado e solvente 60%. A atividade antioxidante pelo método DPPH sofreu influência somente do solvente 60% e os valores pelo método ABTS foram maiores com solvente 80%, modo pulsado e 130 W. Para maior poder de inibição de 50% do radical DPPH (IC50) as condições necessárias são 130 W, modo pulsado e 40% de solvente. Os extratos obtidos através das diferentes metodologias de extração não apresentaram atividade antibacteriana para os diferentes micro-organismos testados. Contudo, pode-se inferir que a casca de cebola roxa é boa fonte de compostos bioativos com ação antioxidante, podendo ser ingrediente em potencial na elaboração de produtos alimentícios inibindo a oxidação lipídica, além de contribuir na redução de resíduos agro-industriais.

Palavras-chave: Cebola roxa. Atividade antioxidante. Fenólicos totais. Atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

BIOACTIVE COMPOUNDS, ANTIOXIDANT ACTIVITY AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY IN RED ONION SKIN (*Allium cepa* L.) SUBMITTED TO DIFFERENT EXTRACTION METHODS

AUTHOR: Vanessa Bordin Viera
ADVISER: Ernesto Hashime Kubota

This study evaluated the use of different methods (focused microwave, ultrasound and conventional agitation) and varying parameters (concentration of solvent, time, temperature, power and pulse) in the extraction of bioactive compounds from red onion skin to obtain an extract with a high content of phenolic compounds, as well as high antioxidant capacity and antibacterial and antifungal activity. The total phenolic content, total flavonoids, anthocyanins, antibacterial capacity and antifungal activity, as well as the in vitro antioxidant capacity, of the extracts were determined by four different methods. The extracts obtained by conventional extraction using agitation had a higher content of total phenolics, flavonoids and total anthocyanins when they were extracted using a higher solvent concentration (80%). With regard to time, it was found that the lowest extraction time of (30 minutes) favored the extraction of compounds with higher antioxidant activity by the DPPH methods and low IC₅₀, and the longest time of (240 minutes) obtained extracts with the highest antioxidant activities using the β -carotene and ABTS methods. The results for focused microwave extraction generally indicated that the highest solvent concentrations (60 to 80%) were more effective in extracting bioactive compounds and, consequently, to obtain extracts with higher antioxidant capacity. Regarding the extraction temperature, it was found that the extracts with highest content of flavonoids and phenolic compounds were obtained at 70 °C. However, the content of total anthocyanins and the DPPH and FRAP methods antioxidant activity of the extracts were not influenced by the extraction temperature. The use of ultrasound to extract bioactive compounds from red onion skin indicated that the extraction of total flavonoids, total anthocyanins and antioxidant activity (FRAP and β -carotene) were efficient at 130 W, with pulsed mode and 60% solvent concentration. The DPPH methods antioxidant activity was only successful at 60% solvent concentration, and the ABTS methods values were highest with 80% solvent, pulsed mode and 130 W power. For the highest inhibiting power of 50% of the DPPH radical (IC₅₀), the best conditions were 130 W, pulsed mode and 40% solvent. The extracts that were obtained through different extraction methods showed no antifungal or antibacterial activity in relation to the different tested microorganisms. However, it can be inferred that red onion skin is a good source of bioactive compounds with antioxidant action and that it can be used as a potential ingredient in the preparation of food products to inhibit lipid oxidation, as well as contributing to reducing agro-industrial waste.

Keywords: Red onion. Antioxidant activity. Total phenolics. Antimicrobial activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Casca de cebola roxa triturada para extração	17
Figura 2 - Extração convencional por agitação em banho ultratermostatizado e agitador da casca de cebola roxa	19
Figura 3 - Extração de compostos bioativos da casca de cebola roxa em forno micro-ondas focalizada.	21
Figura 4 - Extração de compostos bioativos da casca de cebola roxa em sonda ultrassônica	22

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 OBJETIVO GERAL.....	13
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 ANTIOXIDANTES.....	14
2.1.2 Antioxidantes Naturais	15
2.2 CEBOLA	16
2.3 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO.....	18
2.3.1 Extração convencional	18
2.3.2 Extração assistida por micro-ondas focalizada	20
2.3.3 Extração por ultrassom	21
2.4 MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE IN VITRO..	23
3 DESENVOLVIMENTO	25
MANUSCRITO 1.....	25
EXTRACTION OF PHENOLIC COMPOUNDS AND EVALUATION OF THE ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL CAPACITY OF RED ONION SKIN (<i>Allium cepa</i> L.)	25
MANUSCRITO 2.....	53
FOCUSED MICROWAVE-ASSISTED EXTRACTION TO OBTAIN BIOACTIVE COMPOUNDS IN RED ONION SKIN (<i>Allium cepa</i> L.).....	53
MANUSCRITO 3.....	78
EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM DE COMPOSTOS FENÓLICOS E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DA CASCA DE CEBOLA ROXA (<i>Allium cepa</i> L.)	78
4 DISCUSSÃO GERAL	110
5 CONCLUSÃO	114
REFERÊNCIAS	115
ANEXO I	123

1 INTRODUÇÃO

Mudanças nos hábitos alimentares e comportamentais de consumidores impulsionaram a necessidade de desenvolver tecnologias limpas e capazes de assegurar a viabilidade produtiva de alimentos elaborados com ingredientes funcionais. A busca por matrizes benéficas à saúde e que não causem alterações sensoriais indesejáveis ao produto final ganhou ênfase e intensificou o interesse por compostos bioativos de origem vegetal. Estes compostos possuem grande apelo comercial devido à sua ação biológica e por ser uma alternativa como aditivos alimentares e sua utilização no desenvolvimento de alimentos funcionais (CECCARELLI et al., 2010).

A cebola (*Allium cepa L.*), uma das hortaliças mais consumidas é classificada conforme sua cor branca, amarela e vermelha (SHAHIDI; NACZK, 2004). Contêm uma série de fitoquímicos e o seu consumo tem sido associado com a promoção da saúde e redução do risco de doenças vasculares, cardíacas e desordens neurodegenerativas, entre outras (KAUR; JOSHI; KAPOOR, 2009). Entre os fitoquímicos presentes na cebola, podem-se citar os flavonóides, frutanos e compostos organosulfurados considerados importantes na dieta pela contribuição na atividade antioxidante (PAGANGA; MILLER; RICE-EVANS, 1999).

Estudo realizado por WICZKOWSKI et al. (2008) evidenciou que a casca de cebola apresenta maior concentração de compostos bioativos (quercetina) quando comparada com as partes carnosas. As cascas de cebola contêm derivados de quercetina (TAKAHAMA; HIROTA, 2000; FURUSAWA et al., 2002; FURUSAWA et al., 2003) que representam mais de 80% do teor total de flavonóides nas cebolas (FURUSAWA et al., 2002; FURUSAWA et al., 2003; GALDO'N; RODRÍGUEZ; ROMERO, 2008). Além disso, segundo Nuutila; Kammiovirta; Oksman-Caldentey (2002), extratos de cascas de cebola apresentam alta capacidade antioxidante. No entanto, independentemente de altos níveis de flavonóides nas cascas da cebola, elas são descascadas e descartadas antes do processamento.

Diante do atual potencial antioxidante da casca de cebola roxa, um dos desafios é a extração de compostos bioativos com alto rendimento, baixa temperatura, menor tempo e maior economia de solvente. Neste sentido, tecnologias emergentes têm sido cada vez mais investigadas, entre elas, a extração por ultrassom e micro-ondas focalizada.

1.1 OBJETIVO GERAL

Obter extratos a partir da casca de cebola roxa (*Allium Cepa* L.) por diferentes métodos de extração.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter extratos da casca de cebola roxa utilizando micro-ondas focalizada, ultrassom e método convencional por agitação;
- Quantificar o conteúdo de fenólicos, flavonoides e antocianinas totais dos extratos de casca de cebola roxa;
- Determinar a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos obtidos, através de quatro metodologias distintas;
- Detectar atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos de casca de cebola roxa obtidos frente a espécies de micro-organismos de importância em alimentos;

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ANTIOXIDANTES

A FDA (*Food and Drug Administration*) define antioxidante como substâncias utilizadas para preservar e estender a vida-de-prateleira de produtos que contêm lipídios oxidáveis, retardando as reações de oxidação. O antioxidante deve ter propriedades desejáveis como ausência de efeitos indesejáveis na cor, no odor, no sabor, deve ser eficiente em baixas concentrações, estabilidade nas condições de processo e armazenamento, compatibilidade com o alimento e o composto e seus produtos de oxidação não devem ser tóxicos, mesmo em doses altas que normalmente seriam ingeridas com os alimentos (CHIATTONE, 2010).

A atividade antioxidante é a capacidade de um composto em inibir a oxidação lipídica (SHIMOKOMAKI et al., 2006). A atividade antioxidante ocorre através de várias vias: como inibidores de radicais livres (oxidantes preventivos) inibindo a formação de radicais livres a partir de lipídeos; como interruptores da propagação da cadeia de auto-oxidação; como sequestradores de oxigênio singlete; através de sinergismo com outros antioxidantes; como agentes redutores que convertem hidroperóxidos em compostos estáveis; como quelantes de metais e também como inibidores de enzimas pró-oxidativas (POKORNY, 2007; KANCHEVA, 2009).

Devido às suas propriedades protetoras em diferentes estágios do processo oxidativo, os antioxidantes podem ser classificados em primários e secundários. Os antioxidantes primários cessam ou retardam a oxidação doando átomos de hidrogênio ou elétrons aos radicais livres convertendo-os a moléculas menos reativas. Já os antioxidantes secundários agem incluindo a ligação de íons metálicos, convertendo hidroperóxidos a espécies não-radicais, absorvendo radiação UV (ultravioleta) ou desativando o oxigênio singlete (MAISUTHISAKUL; SUTTAJIT; PONGSAWATMANIT, 2005).

Os compostos antioxidantes sintéticos mais utilizados na indústria de alimentos com a finalidade de inibir os processos oxidativos, entre outros, são butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), tercibutilhidroxiquinona (TBQA), trihidroxibutilfenona (THBP) e propilgalato (PG) (SOUSA, et al., 2007). Entretanto, devido a questões de toxicidade de alguns antioxidantes sintéticos e à preferência dos consumidores por alimentos mais naturais e saudáveis, verifica-se atualmente um interesse crescente na busca por antioxidantes naturais

capazes de preservar os alimentos das alterações indesejáveis causadas pelas reações de oxidação e também atuar de forma benéfica sobre a saúde (JAYAPRAKASHA; RAO; SAKARIAH, 2004; OKE et al., 2009; EBRAHIMABADI et al., 2010).

2.1.2 Antioxidantes Naturais

Atualmente diversos estudos têm sido realizados visando verificar o potencial antioxidante dos ácidos fenólicos, com o objetivo de substituir os antioxidantes sintéticos. A utilização de antioxidantes naturais tem abrangido toda a cadeia de produção de carnes, não se restringindo apenas nos produtos finais. Diante deste fato uma diversidade de antioxidantes naturais tem sido estudada para tal fim (PEREIRA, 2009).

Os polifenóis são largamente encontrados nas plantas e contribuem para a cor e sabor dos vegetais (BELITZ et al, 2009). São constituídos de um grupamento hidroxila (-OH) ligados diretamente a um anel aromático (KRICHER, 2011). Os compostos fenólicos são classificados em ácidos fenólicos (ácido hidroxienzóico e hidroxiciânico), flavonoides (antocininas, flavonoides e flavonas), taninos diterpenos (hidrolisáveis e condensados), estilbenos, curcuminóides, cumarinas, lignanas, quinonas e outros (alcaloides fenólicos, terpenóides fenólicos, glicosídeos fenólicos e óleos voláteis) (FRESCO et al., 2006; HUANG; CAI; ZHANG, 2009).

Extratos das plantas ricas em polifenóis são boas opções, pois eles são facilmente obtidos a partir de fontes naturais e evitam a oxidação lipídica em produtos alimentícios. Entre os antioxidantes naturais mais utilizados podem ser citados tocoferóis, ácidos fenólicos e extratos de plantas como alecrim e sálvia (WARNER; NEFF; ELLER, 2003).

Antioxidantes naturais provindos de matérias-primas de diversas fontes vegetais têm sido testados quanto à aplicabilidade em alimentos. Shan et al. (2009) aplicaram extratos de canela, orégano, cravo, casca de romã e semente de uva na carne suína. Todos os extratos aumentaram a estabilidade da carne de porco crua contra a oxidação lipídica, destacando-se o extrato de cravo como o mais eficaz para retardar a oxidação lipídica em carne suína crua.

Ozvural e Vural (2012) avaliaram o efeito do extrato de semente de uva (0,01, 0,03, 0,05, 0,1, 0,3 e 0,5%) em salsichas. Os resultados mostraram que o aumento no nível de extrato de semente de uva em salsichas ocasionou uma diminuição nos valores de TBARS, provavelmente

devido ao elevado teor de antioxidantes contidos no extrato. A adição de 0,01, 0,03, 0,05 e 0,1% do extrato de semente de uva não prejudicou a qualidade sensorial.

Banerjee et al. (2012) investigaram o efeito do extrato de brócolis em pó em nuggets de carne de cabra (1, 1,5 e 2%) em comparação com o controle e BHT(100 ppm). A adição de 1,5 e 2% do extrato de brócolis diminuiu significativamente o valor do pH dos nuggets. Os fenólicos totais nos nuggets com 2% de extrato de brócolis foram semelhantes ao que continha o BHT. O valor de TBARS nos nuggets que continham o extrato de brócolis foi menor ao longo do armazenamento.

2.2 CEBOLA

O gênero *Allium* possui mais de 500 membros, com diferente aparência, cor e sabor, porém apresentam semelhança na bioquímica, fitoquímica e no conteúdo nutracêutico. Possuem atividade antibacteriana e antifúngica, contém enxofre e compostos fenólicos e, por este motivo, despertam grande interesse (RIVLIN, 2001; GRIFFITHS et al., 2002).

A cebola é particularmente rica em dois grupos de compostos com comprovado benefício à saúde humana: flavonoides e sulfóxidos de cisteína (compostos organosulfurados). Dois subgrupos de compostos do tipo flavonoides predominam nas cebolas: as antocianinas (conferem a coloração avermelhada ou roxa aos bulbos) e as quercetinas e seus derivados (conferem coloração amarelada). As antocianinas, quercetinas e seus derivados são de grande interesse pelas suas propriedades anticarcinogênicas (SOUZA, 2008).

Apesar do grande interesse que as cebolas têm despertado na área de antioxidantes, poucos estudos têm abordado a capacidade antioxidante de diferentes espécies de cebola. Cebolas vermelhas, brancas e amarelas, são de fato, conhecidas por conter uma grande quantidade de flavonóides, sendo a maioria derivados glicosilados de quercitina e campferol (LEE; MITCHEL, 2011; SHIM; YI; KIM, 2010). As cascas contêm significativamente maiores teores de flavonoides do que a parte comestível, em cerca de 2-10 g/kg (SUH et al., 1999). Contêm derivados de quercetina (FURUSAWA et al., 2003; TAKAHAMA; HIROTA, 2000), que representam mais de 80% do teor total de flavonoides nas cebolas (FURUSAWA et al., 2003; GALDON; RODRIGUEZ; ROMERO, 2008).

Entretanto, pesquisas envolvendo a atividade antioxidante da cebola pode ser verificada

em estudo realizado por Kim et al. (2010) que ao marinar carne suína no extrato de cebola e alho obtiveram os menores valores de TBARS quando comparados ao controle no período de 7 dias de armazenamento. Além disso, a análise sensorial demonstrou que todas as amostras marinadas nos extratos de cebola e alho apresentaram maior aceitabilidade para todos os atributos quando comparadas com a amostra controle.

Cao et al. (2013) estudaram o efeito de extratos de quitosana (0,5 e 1%), extratos de gengibre+alho+cebola (0,5 e 1,0%), mistura de extratos (mix 1: 1% de quitosana +1% gengibre+alho+cebola e mix 2: 0,5% de quitosana +5% de gengibre+alho+cebola) sobre a vida de prateleira da carne suína durante o armazenamento de 12 dias a 4°C. Como resultado verificaram que o extrato de gengibre+alho+cebola apresentou atividade antioxidante mais elevada quando comparado com o de quitosana.

Contudo, as cascas da cebola são descartadas durante o processamento dos vegetais e tampouco utilizadas na indústria de alimentos. Deste modo, o estudo da casca de cebola roxa triturada (Figura 1) se faz importante considerando-se as necessidades da indústria de alimentos em encontrar novas fontes de aditivos alimentares oriundos de fontes naturais, sua viabilidade na extração, produção e o uso de seus subprodutos.

Figura 1 - Casca de cebola roxa triturada para extração



Fonte: Acervo pessoal do autor (2013)

2.3 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

A palavra “extrato” deriva do latim *extractus*, que significa “coisa extraída de outra”. A extração pode ser realizada através de diferentes processos, como a infusão, a decocção, a digestão, a maceração e a percolação (OLIVEIRA; AKISUE, 2009). Segundo Handa (2008), existe além destes métodos, a extração por soxhlet, a extração hidroalcoólica por fermentação, a extração em contracorrente, a extração por ultrassom e a extração supercrítica. Tem-se, assim, uma ampla variedade de métodos para a extração de compostos bioativos de plantas, devendo a escolha ser baseada na viabilidade econômica e adequabilidade a cada situação em particular.

O objetivo geral da extração de antioxidantes é liberar os compostos fenólicos da estrutura da matriz vegetal a fim de se obter extratos com elevada atividade antioxidante. Os compostos fenólicos antioxidantes estão presentes em pequenas quantidades na matriz sólida natural e, conseqüentemente, os extratos não concentrados deveriam ser utilizados em grandes quantidades para melhorar a estabilidade dos produtos contra a oxidação. No entanto, isso poderia ter um efeito negativo nas características organolépticas e nas propriedades funcionais dos produtos. Deste modo, a escolha da técnica de extração adequada e do solvente é um dos procedimentos mais importantes para melhorar o rendimento da extração dos antioxidantes (SANTOS, 2013).

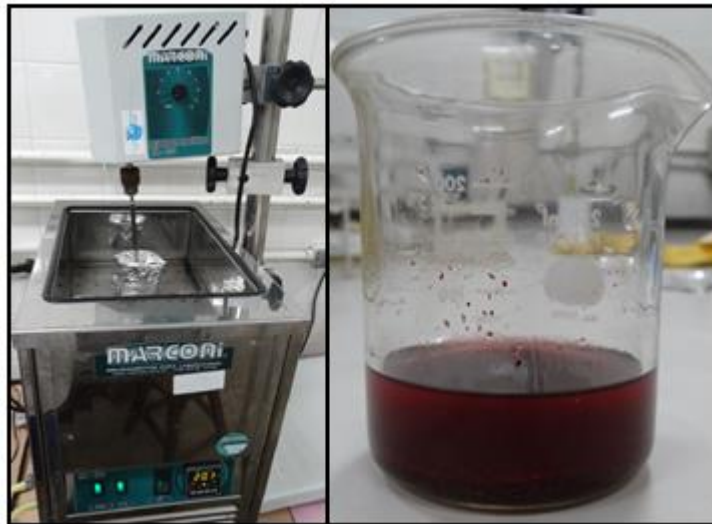
Ao longo da última década, várias técnicas novas de extração foram introduzidas e investigadas, a maioria das quais foram reivindicadas para melhorar a eficiência, a qualidade do extrato, o tempo de extração e consumo de solventes. As técnicas emergentes disponíveis são: extração assistida por micro-ondas (SONG et al., 2011), extração assistida por ultrassom (CARRERA et al., 2011), a extração com fluido supercrítico e a extração com solvente pressurizado (XIAO et al., 2012).

2.3.1 Extração convencional

Para amostras sólidas, uma das primeiras etapas a ser realizada é a transferência dos analitos em estudo para a fase líquida, composta pelo solvente extrator adequado (CASTRO; CAPOTE, 2010). Esse processo, também chamado de extração sólido-líquido ou lixiviação, é uma das metodologias mais antigas empregadas no preparo de amostras (CASTRO; GARCIA-AYUSO, 1998; MILIC et al., 2013). A maceração (Figura 2) é um exemplo de extração sólido-líquida muito utilizada para obtenção de compostos fenólicos de fontes vegetais. Esse

procedimento emprega calor e/ou agitação, para acelerar a dissolução dos analitos no meio extrator. Contudo, apesar da simplicidade e baixo custo, uma baixa eficiência é frequentemente observada, uma vez que o processo de extração é moroso, variando de horas a dias para ser efetuado (CASTRO; GARCIA-AYUSO, 1998; CASTRO, CAPOTE, 2010).

Figura 2 - Extração convencional por agitação em banho ultratermostatizado e agitador da casca de cebola roxa



Fonte: Acervo pessoal do autor (2013)

A extração convencional utilizando um solvente orgânico e/ou água é a técnica mais empregada para a obtenção de extratos com alto teor de compostos fenólicos de diversas matrizes vegetais. Os extratos obtidos são sempre uma mistura de diferentes classes de fenóis (ácidos fenólicos, antocianinas, taninos, entre outros), pois a natureza química dos compostos encontrados em plantas é heterogênea (NACZK; SHAHIDI, 2004).

Estudo realizado por Rodriguez-Rojo et al. (2012) no qual investigaram a utilização de água e etanol para obtenção de extratos da folha de alecrim (*Rosemarinus officinalis* L.) empregando várias técnicas de extração (extração convencional, extração assistida por micro-ondas e extração assistida por ultrassom) e dois diferentes pré-tratamentos (extração dos óleos essenciais e extração dos óleos essenciais combinada com moagem da matriz vegetal) em geral, os extratos aquosos mostraram melhor atividade antioxidante pelo método de inibição do radical livre DPPH•.

2.3.2 Extração assistida por micro-ondas focalizada

A extração assistida por micro-ondas é um método relativamente novo, através da qual a energia de micro-ondas é utilizada para aquecer os solventes polares em contato com amostras sólidas e para particionar os compostos de interesse entre a amostra e o solvente, reduzindo o tempo de extração e do consumo de solventes (PÉREZ-SERRADILLA; LUQUE DE CASTRO, 2011). Também apresentam taxas de extração mais elevadas, melhores resultados com menores custos (GALLO et al., 2010). A extração com solvente utilizando forno micro-ondas pode ser realizada em sistema fechado (sob pressão controlada) ou aberto (sob pressão atmosférica) (CAMEL, 2000; ESKILSSON; BJORKLUND, 2000; KORNILOVA; ROSELL-MELE, 2003).

O sistema aberto é conhecido como extração assistida por micro-ondas focalizada onde a amostra é aquecida de forma homogênea utilizando as micro-ondas focalizadas do sistema (CAMEL, 2000). Durante a extração assistida por micro-ondas focalizada, a radiação eletromagnética é aplicada diretamente na mistura solvente-amostra e é convertida em calor. As moléculas alvos migram da matriz para o solvente devido ao aquecimento muito localizado. A absorção de energia das micro-ondas depende da natureza do solvente e da matriz da amostra. Na maioria dos casos, o solvente selecionado para extração, tais como metanol ou isopropanol, possuem uma alta constante dielétrica e absorvem fortemente energia de microondas. No entanto, na extração de compostos termolábeis, a temperatura de extração é particularmente controlada para evitar a degradação dos componentes envolvidos (OUFNAC et al., 2007).

O forno de micro-ondas focalizadas (Figura 3) caracteriza-se por incidir uniformemente, mas não de maneira contínua as micro-ondas e por possuir um dispositivo que mede a temperatura no interior do mesmo. Pelo painel de controle, localizado na parte externa do forno, é possível programar e monitorar a temperatura e o tempo desejados para cada processo (MATSUI, 2006). Possui um magnetron que propaga as ondas geradas por meio de um guia de ondas até a cavidade. A quantidade de energia das micro-ondas incidentes é controlada pela abertura de fendas posicionadas em cada cavidade. A potência e o tempo de abertura de cada fenda são estabelecidos pela temperatura selecionada na programação do equipamento. Sensores de infravermelho posicionados abaixo de cada frasco reacional possibilitam o controle de temperatura (OUFNAC et al., 2007).

Figura 3 - Extração de compostos bioativos da casca de cebola roxa em forno micro-ondas focalizada.



Fonte: Acervo pessoal do autor (2013)

Diversas pesquisas utilizando micro-ondas têm sido realizadas para extrair compostos fenólicos como as isoflavonas (TERIGAR et al., 2010), hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (CAMEL, 2000), carvona e limoneno (CHEMAT et al., 2011), ácido gálico, ácido vanílico, catequina, ácido p-cumárico, ácido ferúlico e muitos outros compostos fenólicos (PROESTOS; KOMAITIS, 2008), polifenóis do chá e cafeína (PAN; NIU; LIU, 2003), tocoferóis e tocotrienóis (ZIGONEANU et al., 2008), polifenóis da folha de oliveira (RAFIEE et al., 2012; TAGHVAEI et al., 2014). A maioria destes estudos verificaram que a extração por micro-ondas diminuiu o tempo de extração, a utilização de solventes e aumentou a quantidade de compostos fenólicos extraídos.

2.3.3 Extração por ultrassom

O ultrassom é uma onda mecânica que se diferencia do som audível pelos seres humanos por apresentar frequências maiores que 20 kHz (CASTRO et al., 2011; CHEMAT et al., 2011) e propaga-se em meios sólidos, líquidos e gasosos (CASTRO, CAPOTE, 2007; SERRADILLA, CAPOTE, CASTRO, 2007). Um dos fenômenos produzidos quando o ultrassom propaga-se nos líquidos é o fenômeno de cavitação (ESCLAPEZ et al., 2011). A cavitação ocasiona a formação

de cavidades, para onde os gases dissolvidos no sistema migram, formando microbolhas, que aumentam e diminuem de tamanho, gerando ciclos de expansão e compressão até que as bolhas implodem, liberando grande quantidade de calor e exercendo elevadas pressões próximas a região da implosão (CASTRO, CAPOTE, 2007; VEILLET et al., 2010).

O ultrassom exerce um efeito mecânico, permitindo uma maior penetração do solvente na matriz, aumentando a área de superfície de contato entre a fase sólida e líquida (ZOU et al., 2013). Também pode produzir alguns efeitos químicos, devido à produção de radicais livres dentro das bolhas de cavitação (PANIWNYK et al., 2001). Esses radicais são formados devido à dissociação da molécula da água ou de outros gases que possam migrar para o interior da bolha causada pelo calor e a alta pressão produzida durante a implosão das bolhas de cavitação (CASTRO, CAPOTE, 2007).

Esses processos podem ser produzidos por diferentes equipamentos de ultrassom, sendo os mais comumente utilizados o banho de ultrassom e a sonda ultrassônica (Figura 4) (JERMAN et al., 2010). A sonda ultrassônica tem a vantagem de transmitir a energia em uma região mais discreta, favorecendo os processos de extração (LUQUE-GARCÍA, CASTRO, 2003; PRIEGO-CAPOTE, CASTRO, 2004). Devido à sonicação direta, é conveniente resfriar o sistema de extração, pois a absorção da energia ultrassônica gera um aumento de temperatura (SHIRSATH et al.; 2012), o que pode resultar na degradação de substâncias termolábeis.

Figura 4 - Extração de compostos bioativos da casca de cebola roxa em sonda ultrassônica



Fonte: Acervo pessoal do autor (2013)

Nos últimos anos, diversos trabalhos descreveram a extração de compostos bioativos utilizando o ultrassom. Li et al. (2005) otimizaram a extração de ácido clorogênico de folhas frescas, cascas frescas e secas de *Eucommia ulmodies Oliv.* (planta medicinal chinesa). Yang e Zhang (2008) otimizaram a extração assistida por ultrassom para extrair rutina e quercetina de *Euonymus alatus (Thund.)* e verificaram que o método ultrassônico apresentou a melhor eficiência de extração quando comparado com os métodos convencionais. Os resultados indicaram que o rendimento da rutina e quercetina foi altamente dependente do tempo, aumentando rapidamente nos primeiros 30 minutos e, em seguida, mais lentamente nos próximos 90 minutos.

Antocianinas e compostos fenólicos foram extraídos de cascas de uva utilizando o ultrassom. O processo de extração foi otimizado em relação ao solvente, temperatura e tempo de extração (GHAFOOR; CHOI; JO, 2009). Pingret et al. (2012) utilizaram o ultrassom para extração de compostos antioxidantes de bagaço da maçã (resíduo a partir da produção do sumo ou da cidra). O conteúdo de polifenóis totais encontrados foi 30% maior do que o obtido por extração convencional.

2.4 MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

O método ABTS ou TEAC (capacidade antioxidante equivalente em trolox) é baseado no monitoramento do decaimento do cátion-radical ABTS, produzido pela oxidação do ABTS (2,2'azinobis(3-ethylbenzothiaziline-6sulfonate), gerado pela adição de uma amostra contendo antioxidante, através de leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda em 734nm, utilizando um antioxidante sintético, um análogo da vitamina E (Trolox).

O método ABTS tem sido bastante empregado, por ser um método estável e sensível para avaliação de amostras de frutas, hortaliças e vegetais (OZGEN et al., 2006). Este método apresenta vantagens em relação a outros métodos baseados no sequestro de radicais livres, tais como: aplicável a ambos os tipos de antioxidantes (tanto lipo quanto os hidrofílicos), o radical é gerado ao longo de todo o tempo do ensaio, por isso exhibe uma melhor “performance” nos resultados (RUFINO et al., 2007).

O radical livre estável DPPH• possui coloração violeta e absorve luz à 518 nm. Quando o radical é reduzido pelo antioxidante da amostra, a solução violeta sofre descoloração para o

amarelo claro. Quanto mais clara torna-se a solução, mais forte o potencial antioxidante da amostra analisada. Deste modo, torna-se possível avaliar a captura dos radicais livres DPPH• pelo suposto antioxidante (MANSUR, 2011).

Dentre os métodos existentes baseados no sequestro de radicais livres, o DPPH• é frequentemente escolhido na investigação da capacidade antioxidante de diferentes amostras, por ser um método rápido, de baixo custo e capaz de determinar o poder redutor das substâncias analisadas (RUFINO et al., 2010). Grande parte dos estudos expressa os resultados da atividade antioxidante DPPH através do cálculo da concentração inibitória de 50% do radical DPPH (IC50).

O sistema β -caroteno/ácido linoleico é um método espectrofotométrico baseado na descoloração da solução β -caroteno/Ácido Linolêico. Este método avalia a capacidade de inibição de radicais livres, pelo antioxidante utilizado, gerado durante a peroxidação lipídica do ácido linoléico (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006). Geralmente se utiliza o antioxidante sintético butilhidroxidotolueno (BHT) como padrão positivo para comparação dos resultados. Esse método tem sido utilizado para analisar várias matrizes alimentares, principalmente frutos e sementes ricas em lipídeos (LIMA, 2008).

No método FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) o complexo férrico-tripiridiltriazina (FeIII-TPZ) é reduzido ao complexo ferroso (FeII-TPZ), na presença de um antioxidante e em condições ácidas. O complexo formado por esta reação possui uma coloração azul intensa, com absorção máxima a 593 nm (BENZIE, STRAIN, 1996).

3 DESENVOLVIMENTO

MANUSCRITO 1

**EXTRACTION OF PHENOLIC COMPOUNDS AND EVALUATION OF
THE ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL CAPACITY OF RED
ONION SKIN (*Allium cepa* L.)**

**Artigo aceito para publicação na Revista International Food Research Journal
(IFRJ) (Anexo I)**

(Formatado conforme as normas da revista)

ORIGINAL ARTICLE

Extraction of phenolic compounds and evaluation of the antioxidant and antimicrobial capacity of red onion skin (*Allium cepa* L.)

^{1,*}Viera, V.B., ¹Piovesan, N., ²Rodrigues, J.B., ¹Mello, R. de O., ¹Prestes, R.C., ⁴Santos, R.C. V dos., ³Vaucher, R. de A., ¹Hautrive, T. P., ¹Kubota, E. H.

¹Department of Science and Food Technology, Centre for Rural Sciences, Federal University of Santa Maria – UFSM, Rio Grande do Sul, Brazil

²Department of Food and Nutrition, University of Campinas, Faculty of Food Engineering - UNICAMP

³Biomedicine Course, Health Sciences, Centro Universitário Franciscano - UNIFRA, Rio Grande do Sul, Brazil

⁴Department of Microbiology and Parasitology, Health Sciences Center, Federal University of Santa Maria - UFSM, Rio Grande do Sul, Brazil.

*Corresponding Author: Email: vanessa.bordinviera@gmail.com

Abstract

This study evaluated the content of phenolic compounds, total flavonoids and anthocyanins, as well as the antioxidant and antimicrobial activity of red onion skin extract (*Allium cepa L.*) that was obtained by conventional extraction at different times (30, 60, 120 and 240 minutes) and using different concentrations of ethanol (20, 40, 60 and 80%). The antioxidant activity of the extracts was evaluated using the following methods: DPPH radical sequestration, the inhibition of the auto-oxidation of the β -carotene system, FRAP and IC_{50} . The antimicrobial activity was evaluated by the disk diffusion method. The best results for phenolics, flavonoids and anthocyanins were found using extraction with 80% solvent at 165, 60 and 120 minutes respectively. In relation to the antioxidant activity using the FRAP, DPPH and IC_{50} methods, the best values were found using 80% solvent at 120, 30 and 30 minutes of extraction respectively. The best value for antioxidant activity determined by the β -carotene method was with 59.32% solvent at 240 minutes of extraction. No antimicrobial activity of the extracts in relation to the tested microorganisms was detected. The results of this study showed that the concentration of 80% ethanol favored the extraction of phenolic compounds, flavonoids and total anthocyanins, as well as producing the highest antioxidant activities found by the different methods. The best extracts in terms of antioxidant activity by the DPPH and IC_{50} methods were obtained with the lowest extraction time of 30 minutes, in contrast to the extraction time of 240 minutes, which produced the highest antioxidant activity by the β -carotene methods.

Keywords: natural antioxidant, onion skin, conventional extraction

Introduction

Increasing interest in replacing synthetic food antioxidants by natural food antioxidants has intensified the demand for plant materials for the identification of new antioxidants. Moure *et al.* (2001) studied the extraction of antioxidant compounds from industrial waste (peanut shell,

tomato skin, lemon skin, grape seed, etc) and identified important antioxidants. In this context, waste from onions has been shown to be a source of antioxidants and compounds that work to prevent the blackening caused by enzymatic reactions (Roldan *et al.*, 2008).

The onion (*Allium cepa L.*) is a versatile vegetable from the Allium family that is appreciated throughout the world, not only for its taste but also as a significant source of many beneficial compounds. Studies have revealed the presence of flavonoids in various different varieties of onions, along with other bioactive compounds (Lachman *et al.*, 2003), almost all of which are located primarily in the skin. Wiczkowski *et al.* (2008) found a higher concentration of quercetin in onion skin than in the fleshy part of the onion. Nuutila *et al.* (2002) showed that onion skin extracts also have high antioxidant capacity. Study by Cao *et al.* (2013) the mixture of onion extract, garlic and ginger was effective against lipid oxidation of pork meat.

There are several methods for the extraction of antioxidants from plants. One of the most traditional methods (agitation, maceration, etc.) uses organic solvents (such as water, ethanol, ether and methanol) to improve the efficiency, the quality of the extract, the extraction time and the consumption of solvent.

This study aimed to optimize the extraction of antioxidant compounds from red onion skin using the above-mentioned conventional methods with different concentrations of solvent and times.

Materials and Methods

Raw materials

The red onions were acquired in a commercial establishment located in the city of Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. The onions were selected for the absence of defects, pests and diseases. The surfaces were washed with mild detergent to remove dirt and they were sanitized with 200 mg L⁻¹ of sodium hypochlorite for 20 min. They were then manually peeled with stainless steel knives. The skins were placed on trays and placed in a forced-air circulation oven

(Marconi, MA-035/100, Piracicaba, Brazil) at 50°C for 24 hours. The skins were then crushed in a refrigerated analytical mill at 4°C (Quimis model Q298A21, Brazil) with the aid of an ultra-thermostatic water bath (Solab, model SL-152/10) and stored in amber bottles at a temperature of - 18°C until the extracts were obtained.

Obtaining the extracts – conventional extraction

For the conventional extraction, three grams of sample powder were placed in a 250 mL glass beaker, and 60 mL of cereal alcohol 1:20 w/v (20%, 40%, 60% and 80%) were added. In the extraction by agitation (conventional method) the beaker with the mixture was kept under constant stirring (80 rpm) using a mechanical shaker (Marconi, MA-0.39, Piracicaba, Brazil) for times (30, 60, 120 and 240 min) and temperatures $25 \pm 2^\circ\text{C}$ that were controlled with the aid of ultra-thermostatic water bath (Solab, model SL-152/10). After extraction, the solution was centrifuged at 3000 rpm for 15 min, filtered through qualitative filter paper (No. 1) and then the volume was adjusted to 50 mL. The extracts were stored at -18°C until further analysis.

Determination of total phenolic content (TPC)

The total phenolic content in the extracts was determined by the Folin–Ciocalteu described method by Roesler (2007). Briefly, 200 μL of extract was mixed with 1000 μL of 1:10 diluted Folin–Ciocalteu reagent. The solutions were mixed thoroughly and incubated at room temperature (27°C) for 5 min. After incubation, 800 μL of 7.5% sodium carbonate (Na_2CO_3) solution was added and again incubated in a water bath at 50°C for 5 min. The absorbance of the reaction mixtures was measured at 765 nm using a UV– Vis spectrophotometer (Biospectro, model: SP - 220). The absorbance of the extract was compared with a gallic acid standard curve for estimating the concentration of TPC in the sample. The TPC was expressed as mg of gallic acid equivalents (GAE) per gram of powder on a dry weight (DW) basis.

Determination of flavonoid content

The total flavonoid content was measured using the colorimetric assay developed by Zhishen *et al.* (1999). A known volume (0.5 mL) of the extract was added to a test tube and at zero time, 150 μL of 5% NaNO_2 was added. After 5 min, 150 μL of 10% AlCl_3 was added and after 6min, 1 mL of 1 M NaOH was added, followed by the addition of 1.2 mL of distilled water. The sample absorbance was read at 510 nm using a UV/Vis spectrophotometer (Biospectro, model: SP - 220). The absorbance of the extract was compared with a quercetin standard curve using concentrations of 0 to 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ for estimating the concentration of flavonoid content in the sample. The flavonoid content was expressed as mg of quercetin equivalents (QE) per gram of powder on a dry weight (DW) basis.

Determination of total anthocyanin content

The anthocyanin content was determined by the pH-differential method (Giusti and Wrolstad, 2001). Each extract (0.5 mL) was separately diluted with 2.5 mL of 0.025M potassium chloride buffer, pH 1.0 and 0.4M sodium acetate buffer, pH 4.5. The diluted solutions were then left at room temperature for 15 min and the absorbance of each dilution was read at 520 and 700 nm against a blank cell filled with distilled water. The anthocyanin content was calculated using the following equation:

$$\text{Anthocyanins content}_{(\text{mg}/100\text{g of dry matter})} = A \times MW \times DF \div (\epsilon \times W)$$

Where: A = absorbance $(A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}1.0} - (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}4.5}$, MW= molecular weight of cyanidin-3-glucoside ($\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{O}_6$, 449.2), DF = dilution factor, ϵ = molar absorptivity (26900), and W= sample weight (g).

In vitro antioxidant assays

DPPH assay

The radical scavenging activity of the extracts in relation to the DPPH radical was measured using the method of Brand-Williams *et al.* (1995), modified as follows: an aliquot (0.5 mL) of methanolic solution containing different concentrations (0.3; 0.6; 1.25; 2.5; 5.0; 10; 15; 20; 25; 30; 35 and 40 mg/mL) was added to 2.5 mL of methanol DPPH solution (0.1 mM). The mixture was shaken gently and left to stand at room temperature in the dark for 30 min. Thereafter, the absorbance was read at 515 nm. The scavenging activity was measured as the decrease in absorbance of the samples in comparison with the DPPH standard solution. The results were expressed as radical scavenging activity percentage (%) of the DPPH radical according to the following formula:

$$\%DPPH_{radical\ scavenging} = [(A_0 - A_s) \div A_0] \times 100$$

The TEAC compound (Trolox equivalent antioxidant capacity) (range of 0 to 100 μ M) was used for the calibration standard curve. The results were expressed in μ mol of trolox equivalents per gram of powder on a dry weight (DW) basis (μ mol TE/g⁻¹)

Where A_0 is the absorbance of the control and A_s is the absorbance of the sample. The effective concentration had 50% radical inhibition activity (IC_{50}), expressed as mg extract/ mL, which was determined from the graph of the free radical scavenging activity (%) against the extract concentration.

Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

The FRAP method was performed according to Benzie and Strain (1996), with modifications proposed by Pulido *et al.* (2000). In this assay, 3.6 mL of FRAP reagent (0.3 M, pH 3.6 acetate buffer, 10 mM TPTZ and 20 mM ferric chloride) were mixed with 200 μ L of extract diluted in distilled water and then incubated for 30 min at 37°C. The FRAP solution was used as reference

reagent and the absorbance was read at 593 nm. The TEAC compound (Trolox equivalent antioxidant capacity) (range of 0 to 25 μM) was used for the calibration standard curve. The results were expressed in μmol of trolox equivalents per gram of powder on a dry weight (DW) basis ($\mu\text{mol TE/g}^{-1}$)

β -carotene bleaching assay

The assay was performed as described by Cao *et al.* (2009) with some modifications. In brief, 0.01g of β -carotene dissolved in 10 mL of chloroform was mixed with 40 mg of linoleic acid and 400 mg of Tween 40 in a flask. After removing the chloroform in a rotary vacuum evaporator at 40°C for 10 min, 100 mL of oxygenated distilled water was slowly added to the oily residue with vigorous agitation to form an emulsion. A 4.5 mL aliquot of the emulsion was added to a tube containing 0.5 mL of extract sample solution of different concentrations and the absorbance was measured immediately at 470 nm against a blank consisting of the emulsion without β -carotene. The tubes were placed in a water bath at 50°C and the oxidation of the emulsion was monitored spectrophotometrically by measuring the absorbance at 470 nm every 15 min until 120 min had passed. The antioxidant activity (AA) of the sample extract was evaluated in terms of the bleaching of β -carotene using the following equation:

$$\text{Inhibition \%} = [(A_t - C_t) \div (C_o - C_t)] \times 100$$

Where A_t and C_t are the absorbance values of the test sample and control, respectively, after a certain time (t) of incubation and C_o is the absorbance value for the control, measured at the beginning of the experiments.

Determination of in vitro antimicrobial activity

The red onion skin extracts were individually tested against *Escherichia coli* ATCC 25922, *Shigella flexneri* ATCC 12022, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Pseudomonas aeruginosa* PA01, *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708,

Salmonella enteritidis clinical isolate, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Bacillus cereus* ATCC 9634, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35985, *Enterococcus faecium* ATCC 6569, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Streptococcus sp* clinical isolate, *Candida kefyr* ATCC 66028 and *Saccharomyces cerevisiae* (environmental isolate).

For the disk diffusion technique, suspensions of microorganism were prepared in 0.9% NaCl solution and compared to the turbidity of 0.5 on the Mcfarland scale (equivalent to approximately 1.5×10^8 colony forming units/mL). Using sterile swabs, the bacterial suspensions were sown on the surface of Petri dishes containing about 15 mL of Mueller-Hinton agar with a thickness of approximately 4 mm.

Sterilized filter paper disks, six mm in diameter, containing 10 μ L of distinct compounds were placed on the surface of the plates in contact with the inoculum of the microorganism. The plates were incubated at 37°C for 24 hours (for the bacteria) and for 48 hours at 25°C (for the fungi) in an oven. After the incubation time, the formation of halos was analyzed. The tests were performed in triplicate and the results were expressed in mm as the arithmetic average of the diameter of the inhibition halos that were formed around the disks. The following were used as inhibition controls: ketoconazole 50 μ g (Biorad) for fungi; polymyxin 300 units (Biorad) for gram-negatives; and vancomycin 30 μ g for gram-positives.

Statistical Analysis

The results were submitted to analysis of variance (ANOVA) and their means were set by the method of ordinary least squares and compared by Tukey's test at a significance level of 5% ($p < 0.05$). Regardless of the significance of the interactions, the trends were tested via contrast from the coefficients for the interpolation of the orthogonal polynomials. Additionally, descriptive statistical analysis and Pearson's simple linear correlation were performed between the variables that were studied. The statistical analyses were performed using the SAS® - Statistical

Analysis System, version 9.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) at a 5% significance level (Khattree and Naik, 2000).

Results and Discussion

Total phenolic compounds

Methanol, ethanol, acetone, ethyl acetate, and combinations of these, have been frequently used to extract polyphenols using different proportions of water resulting in different conditions of interactions with the matrices (Dai and Mumper, 2010). In this study, grain alcohol (ethanol) was used as solvent because of its extraction power and safety in terms of human consumption, since it is used in the food industry. The extraction temperature was set at 25°C bearing in mind that high temperatures increase the chance of the oxidation of phenolic compounds.

Table 1 shows the average values for the content of phenolic compounds, flavonoids and anthocyanins for the red onion skin extracts obtained by the conventional method under varying conditions of solvent concentration and extraction times.

There was an interaction ($P < 0.05$) between the solvent and extraction time for total phenolics. The total phenolic content increased ($P < 0.05$) as the concentration of the solvent was increased for the times of 60, 120 and 240 minutes respectively, as can be seen in the following linear equations; $\hat{y}_{T60} = -117.13 + 8.64S$ ($r^2 = 0.89$) $\hat{y}_{T120} = 5 + 8.5S$ ($r^2 = 0.95$); $\hat{y}_{T240} = -120 + 9.33S$ ($r^2 = 0.80$). However, with a 30 minute extraction time, the values for total phenolics were invariant as a function of the solvent concentration.

Studying the influence of the concentration of ethanol (40-60%) in the extraction of phenolic compounds from different parts of onions, Kiassos *et al.* (2009) also reported that increasing the ethanol concentration resulted in a better extraction of these compounds, being 60% more efficient.

The solubility of phenolic compounds is influenced by the polarity of the solvents that are used, by their degree of polymerization, and by their interaction with other constituents of the plant (Lyanna-Pathirana *et al.*, 2005; Su *et al.*, 2007). Considering that there are polyphenols with different polarities in plants, the use of a solvent that is highly polar or apolar is not recommended in order to enable an efficient extraction of these constituents. Thus, the results of this study corroborate the above statement, given that the highest values for total phenolic content were obtained using the concentration of solvent with an intermediate polarity (80%). However, according to Chirinos *et al.* (2007) low extraction of phenolic compounds in concentrations of 20 to 40% solvent may be because the solvent has a higher amount of water, and a water is responsible for extracting greater amounts of impurities (organic acids, carbohydrates, polysaccharides) which may interfere with the determination of total phenolic compounds

As regards the type of raw material used in the present study (red onion skin), the soluble phenolic compounds are generally located in compartments within the cell vacuoles (in free form or conjugated) and the insoluble phenolic compounds are generally linked to cell wall structures, requiring a longer time for extraction. This was demonstrated in this study: a quadratic behavior with 80% solvent in function of time $y_{S80} = 184.01 + 6.94T - 0.021T^2$ ($r^2=0.70$) with a maximum point at 165.24 minutes. Therefore, the extraction of total phenolic compounds was optimized with 80% solvent extraction and 165 minutes extraction time, and was estimated to be 757.38 mg GAE/g of red onion skin.

Likewise, Tan *et al.* (2013) found quadratic behavior for the extraction of total polyphenols from the stems of henna plants (*Lawsonia inermis*) in function of the extraction time, with an increase from 30 to 270 minutes followed by a decline until 360 minutes.

Total flavonoid content

There was an interaction ($P < 0.05$) between the concentration of the solvent and the extraction times for the total flavonoid values. The extraction of total flavonoids increased as the concentration of solvent was increased for the extraction times. The following linear equations: $\hat{y}_{T30} = 20.39 + 0.18S$ ($r^2 = 0.62$); $\hat{y}_{T60} = 17.15 + 0.29S$ ($r^2 = 0.76$); $\hat{y}_{T120} = 19.09 + 0.21S$ ($r^2 = 0.96$); $\hat{y}_{T240} = 17.40 + 0.25S$ ($r^2 = 0.99$) show that the greatest slope was obtained after 60 minutes of extraction, indicating a higher level of extraction. However, with 80% solvent there was no change in the total flavonoid content as a function of extraction time. Thus, the extraction of flavonoids was optimized at 40.35 mg QE/g of dry onion skin using 80% solvent and 60 minutes extraction time. When Chew *et al.* (2011) evaluated the extraction of total flavonoids in *Centella asiatica* with 20 to 100% ethanol they found the best values for total flavonoids using 60% ethanol.

In general, longer extraction times facilitate the extraction of bioactive compounds. However, the extraction time with 60% solvent negatively influenced the levels of total flavonoids: $\hat{y}_{S60} = 39.03 - 0.03T$ ($r^2 = 0.51$). The slope indicated that an increase in extraction time led to a reduction in the extraction of total flavonoids. This reduction may have occurred due to the exposure of bioactive compounds to oxidative degradation. However, no change in total flavonoid content as a function of extraction time was observed in the other solvent concentrations. Chew *et al.* (2011) used 60% ethanol and times of 60 and 120 minutes for the highest values for the extraction of total flavonoids from *Centella asiatica* and there was no difference ($P > 0.05$) between the times.

Total anthocyanins

Interaction ($P < 0.05$) was observed between the extraction time and concentration of solvent for the values of total anthocyanins. The linear equations $\hat{y}_{T30} = 15.07 + 2.83S$ ($r^2 = 0.85$);

$\hat{y}_{T120} = -36.07 + 4.26S$ ($r^2=0.99$); and $\hat{y}_{T240} = 15.65 + 2.89S$ ($r^2=0.93$) showed that at times of 30, 120 and 240 minutes there was a greater extraction of total anthocyanins with an increased concentration of solvent. It can be seen that the slope (4.26) indicated the highest level of extraction, which occurred at 120 minutes. The extraction time of 60 minutes showed quadratic behavior, which was described by the equation: $\hat{y}_{T60} = -382.23 + 24.32S - 0.205S^2$ ($r^2=0.58$), with a peak at 59.32% of solvent. On the other hand, the anthocyanins were not influenced by the extraction times with 20, 40 and 80% of solvent. However, with 60% of solvent the extraction was greatest ($P < 0.05$) at 60 minutes, even without adjusting ($P > 0.05$) the regression. Therefore, considering that increases in solvent concentration increased the level of total anthocyanins, the extraction of anthocyanins was optimized at 304.73 mg QE/g of dry onion skin using 80% solvent and 120 minutes extraction time.

The best extraction of anthocyanins, which was caused by the increase in the ethanol concentration, may have been due to the polarity of the anthocyanin molecules, which contain residual groups hydroxyl, methoxyl and that glicosilas that are attached to their aromatic rings, thus making them more soluble in polar solvents such as ethanol. Also, as Dai and Mumper (2010) have indicated, ethanol plays an important role in breaking the hydrogen bonds and hydrophobic bonds that exist between anthocyanin-protein and anthocyanin-cellulose in the water-ethanol system, thereby increasing the power of extraction. Based on the results of the present study, to obtain the highest anthocyanin content a combination of a higher ethanol concentration and a longer extraction time was necessary. This result was probably associated with the use of a low temperature (25°C), which caused a delay in the diffusion of the compounds desired by the extraction liquid. Studies have reported that for the efficient extraction of anthocyanins the process should be conducted at temperatures ranging from 20 to 50°C because temperatures above 70°C have been shown to cause rapid degradation of anthocyanins.

In contrast, Khiari *et al.* (2009) extracted bioactive compounds from brown onion residue and obtained higher anthocyanin results with a longer extraction time (6 hours). Cacace and Mazza (2003) found higher levels of anthocyanins in ethanol concentrations of 39 and 67%. In concentrations between 67-95% there was a reduction in the diffusion coefficient.

Antioxidant activity

Due to the fact that reactions involving antioxidant activity are complex, antioxidant activity should not be judged by a single method. For this reason, in the present study the antioxidant activity of red onion skin extracts were evaluated by different methods, i.e., FRAP, DPPH, IC₅₀ calculated and β -carotene (Table 2).

There was an interaction ($P < 0.05$) between the extraction time and the solvent concentration for the FRAP values. The times of 30 and 60 minutes showed quadratic behavior: $\hat{y}_{T30} = -89.23 + 5.70S - 0.047S^2$ ($r^2 = 0.53$) and $\hat{y}_{T60} = -137.76 + 8.02S - 0.066S^2$ ($r^2 = 0.55$) respectively, with peak concentrations of extraction using 60.6 and 60.7% solvent. For the times of 120 and 240 minutes, as the solvent concentration increased demonstrated by the linear equations $\hat{y}_{T120} = -25.82 + 1.78S$ ($r^2 = 0.89$) and $\hat{y}_{T240} = -15.65 + 1.35S$ ($r^2 = 0.92$), respectively there was an increase in the FRAP values.

The solvent concentrations of 20 and 40% showed no difference ($P > 0.05$) for FRAP in terms of the extraction times. However, there was an interaction ($P < 0.05$) between the solvent concentration and extraction time for the solvent concentrations of 60 to 80%, which could be represented by the linear equations $y_{S60} = 148.71 - 0.34T$ ($r^2 = 0.76$) and $y_{S80} = 55.79 + 0.22T$ ($r^2 = 0.56$), respectively. Through the coefficient it was noticed that the time had a negative influence on FRAP at a 60% concentration of ethanol. This same behavior was also observed in relation to flavonoids, demonstrating that the latter were responsible for the reducing power of these extracts. Using an 80% concentration of ethanol, an increased extraction time resulted in a

higher reducing power of the red onion skin extract. The extract with the highest reducing power (116.58 $\mu\text{mol TEAC/g}$ of red onion skin) was found using the conditions of 80% solvent and 120 minutes for extraction.

According to Jayanthi and Lalitha (2011), compounds with reducing power indicate that they are electron donors and they can reduce the oxidizing form of intermediate processes of lipid peroxidation, so that they can act as primary and secondary antioxidants.

For the values of antioxidant activity (DPPH) there was no interaction ($P > 0.05$) between the extraction time and the concentration of the solvent, which was represented by the following general equation for linear behaviour: $\hat{y}_{\text{DPPH}} = 5.37 + 0.98S$ ($r^2 = 0.96$). The antioxidant activity increased in line with increases in the concentration of solvent, demonstrating behavior with a linear trend. However, there was no difference ($P > 0.05$) between the concentrations of 60 and 80% solvent. The extraction time did not influence the DPPH values of the extracts. Given the above, the extract with the best antioxidant capacity was that with 80% solvent and 30 minutes extraction time.

In a study by Thoo *et al.* (2013), the factor of time influenced the antioxidant capacity of extracts of *Andrographis paniculata* (a medicinal plant). There was difference ($P < 0.05$) between the times (60, 120, 180, 240 and 300 minutes) and the extract with the best antioxidant capacity was found using an extraction time of 60 minutes; at an extraction time of 120 minutes there was a reduction in antioxidant capacity. This phenomenon has also been confirmed by Liyana-Pathrina and Shahidi (2005), where prolonged extraction caused the decomposition of active compounds in wheat.

There was interaction ($P < 0.05$) between the extraction time and concentration of solvent for the IC_{50} values. The IC_{50} values reduced ($P < 0.05$) with increasing concentration of solvent, as shown in the linear equations $\hat{y}_{\text{T30}} = 2.87 - 0.03S$ ($r^2 = 0.67$); $\hat{y}_{\text{T60}} = 3.21 - 0.03S$ ($r^2 = 0.95$) for the times of 30 and 60 minutes. The times of 120 and 240 minutes showed quadratic behavior

$\hat{y}_{T120}=4.38-0.11S+0.0008S^2$ ($r^2=0.99$; $\hat{y}_{T240}=4.82-0.14S+0.001S^2$ $r^2=0.99$), indicating that the minimum points of extraction were found in concentrations of 68.75 and 70% respectively. According to Negri *et al.* (2009), the lower the IC_{50} value the higher the antioxidant power of an extract.

The interaction ($P < 0.05$) between ethanol concentration and extraction time also occurred at concentrations of 40 and 60% ethanol as shown in the linear equations $\hat{y}_{T30}=2.87-0.03S$ ($r^2=0.67$); $\hat{y}_{T60}=3.21-0.03S$ ($r^2=0.95$). The angular coefficients (-0.005) and (-0.003) indicated that as the time increased, the IC_{50} values of these concentrations reduced, which was a favorable result considering that the lower the IC_{50} the higher the ability to inhibit the extract. However, the increased time of extraction using 80% ethanol concentration ($\hat{y}_{S80}=0.59+0.002T$ $r^2=0.96$) produced extracts with lower inhibition capacity, necessitating a higher concentration of extract to inhibit 50% of the free radical DPPH.

Given these results, it can be inferred that onion skin can be used as a good alternative as a primary antioxidant to act in the inhibition of oxidation reaction, combining with free radicals or reacting with hydrogen peroxide. The extract with the highest inhibition capacity was found using 80% solvent and 30 minutes of extraction.

Table 2 shows that red onion skin extract can inhibit the oxidation of linoleic acid at a concentration of 12.5 mg/mL.

There was interaction ($P < 0.05$) between the solvent concentration and extraction time for β -carotene. At times of 60, 120 and 240 minutes the following quadratic equations:

$$\hat{y}_{T60}=-15.53+2.42S-0.016S^2 \quad (r^2=0.96), \quad \hat{y}_{T120}=-17.97+2.48S-0.016S^2 \quad (r^2=0.99) \quad \text{and}$$

$\hat{y}_{T240}=-53.04+3.60S-0.023S^2$ ($r^2=0.99$) showed that the greatest potential inhibitors were found using respective concentrations of 75.63, 77.50 and 59.32%.

The interaction ($P < 0.05$) between time and concentration of solvent could also be observed in the solvent concentrations of 20 and 80% through the linear behavior of the following equations:

$$\hat{y}_{S20} = 44.45 - 0.15T \quad (r^2 = 0.72) \quad \text{and} \quad \hat{y}_{S80} = 60.95 + 0.11T \quad (r^2 = 0.64).$$

In terms of solvent at a concentration of 20%, the slope (-0.15) indicated that an increase in extraction time had a negative influence, which resulted in a reduction in the inhibiting power of the extracts. In contrast, the extraction performed with 80% solvent revealed that increased extraction time resulted in an extract with a higher inhibition potential.

According to Porter (1993), hydrophilic antioxidants are more effective than hydrophobic antioxidants in oil emulsion because they act at the oil-water interface. In turn, hydrophobic antioxidants inhibit oxidation in the lipid phase of emulsions. In fat emulsions, the phenolics are generally balanced in water, emulsifier (Tween 20), micelles and lipid phase, which increases their hydrophilic property, with a consequent increase in lipid oxidation. It is possible that the phenolic compounds of the extracts with 60 and 80% ethanol and higher extraction times (60, 120 and 240 minutes) achieved this balance, while the other extracts remained primarily in the lipid phase of the system, thus explaining the greater inhibiting power shown by these extracts.

Given the studied conditions, the extract that was obtained with 59.32% solvent and an extraction time of 240 minutes showed the highest inhibition percentage (79.53%).

Pearson correlation coefficients

The correlations between total antioxidant activity and phenolic content, total flavonoids and anthocyanins activity can be seen in Table 3.

The results showed a positive correlation between the content of total phenols and total flavonoids ($R^2 = 0.66$). This was expected because flavonoids are a sub-group of polyphenols. However, a positive and strong correlation was found between total flavonoids and anthocyanins ($R^2 = 0.85$), indicating that high concentrations of total flavonoids were accompanied by high concentrations of anthocyanins in the red onion skin extracts.

The reducing power of the extract that was provided by the FRAP method had a positive correlation with the total flavonoids ($R^2=0.85$), total anthocyanins ($R^2=0.84$) and total phenolics ($R^2=0.51$). This trend indicates the implication of total flavonoids and the sub-class of anthocyanins in the donation of electrons. Confirming the correlation results of this study demonstrated that the conditions that favored the maximum extraction of anthocyanins were the same as for the extracts with higher reducing capacity (FRAP).

The correlation value indicated that the DPPH antioxidant activity was weakly related to the anthocyanins ($R^2=0.39$) and moderately with the total flavonoids ($R^2=0.51$) and phenolics ($R^2=0.56$).

Cheng *et al.* (2013) studied red and yellow onions and found a strong positive correlation between the total flavonoid content ($R^2=0.82$) and antioxidant activity (DPPH). However, the correlation between total phenolics and DPPH ($R^2=0.62$) was similar to that found in this study. In contrast, Nuutila *et al.* (2003) reported a smaller correlation between antioxidant activity and the TPC of different species of garlic. Regarding the IC_{50} , it was observed that that the anthocyanins, flavonoids and phenolics were negatively-correlated, and that the flavonoids (-0.68) were most strongly correlated to the minimum concentration of extract to inhibit 50% of the free radical DPPH.

The self-oxidation of β -carotene/linoleic acid is a test that differs from the other two methods of evaluation of antioxidant activity (DPPH) because its reaction matrix is an emulsion. In this analysis, the total flavonoids indicated that they were responsible for the inhibition of auto-oxidation of β -carotene, showing a moderate positive correlation ($R^2=0.75$), which was higher than for the phenolics ($R^2=0.69$) and anthocyanins ($R^2=0.57$). According to Lanzotti (2006), flavonoids are known to be good inhibitors of lipid oxidation in onions.

In this study, the weak correlation ($R^2=0.39$) between the average values of TEAC DPPH and TEAC FRAP showed that the compounds present in the extracts indicated that antioxidants are

reducing agents due to their ability to donate a single hydrogen atom or electron for reduction; however, not all reducing agents are antioxidants.

Antibacterial and antifungal activity

No antibacterial (gram-positive and gram-negative bacteria) and antifungal activity was found for all the extracts of red onion skin. Some reported data on antibacterial activity contradicts the results found in the present study (Najjaa *et al.*, 2011). The latter authors reported strong antibacterial activity in relation to *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus* and *Staphylococcus aureus* in extract of *Allium roseum*. Dziri *et al.* (2011) confirmed the antimicrobial activity of extract of pink garlic (*Allium roseum var. odoratissimum*) in relation to *Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. Boo *et al.* (2012) investigated different natural pigments and found low antimicrobial activity in onion skin (*Allium cepa L.*) in relation to *Escherichia coli*; most of the other pigments showed high antimicrobial activity against this bacteria.

Despite the fact that red onion skin extracts contain a high content of phenolics, flavonoids and anthocyanins, antimicrobial activity does not seem to be closely related to these pigments. The cause of these contrary results may have been due to the extraction process, the source of the tested plants, and the microorganisms that were tested. However, our findings reported the absence of antimicrobial and antifungal activity in red onion skin extracts.

Conclusion

The results of this study demonstrated that the content of phenolic compounds, total flavonoids and anthocyanins, as well as the antioxidant activities of the extracts, had higher values when subjected to extraction with 80% ethanol. With respect to the extraction time, it was concluded that the shortest extraction time of 30 minutes favored the extraction of compounds with greater antioxidant activity using the DPPH and IC₅ methods. The longest extraction time of 120 and 240

minutes obtained extracts with the highest antioxidant activities using the FRAP and β -carotene respectively methods. The extracts did not show antifungal or antibacterial activity for the different tested microorganisms.

Extracts of red onion skin can be a viable technological alternative to be used as a natural antioxidant in the preparation of meat products because they have high levels of antioxidant activity, thereby prolonging the shelf life of such products.

Acknowledgements

The authors wish to thank the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES)/FAPERGS for providing scholarship to the first named author and also the laboratories of the Industrial Chemistry and Environmental sector of the Department of Chemistry of the Federal University of Santa Maria, RS.

References

Benzie, I. F. F. and Strain, J. J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry* 239 (1): 70-76.

Boo, H. O., Hwang, S. J., Bae, C. S., Park, S. H., Heo, B. G. and Gorinstein, S. 2012. Extraction and characterization of some natural plant pigments. *Industrial Crops and Products* 40 (1): 129-135.

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

Cacace, J. E. and Mazza, G. 2003. Optimization of extraction of anthocyanins from black currants with aqueous ethanol. *Journal of Food Science* 68 (1): 240-248.

Cao, L., Si, J. Y., Liu, Y., Sun, H., Jin, W., Li, Z., Zhao, X. H. and Pan, R. L. 2009. Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant properties of *Mosla chinensis* Maxim. *Food Chemistry* 115 (3): 801-805.

Cao, Yumin., Gu, Weigang., Zhang, J., Chu, Yin., Ye, Xingqian., Hu, Yagin and Chen, Jianchu. 2013. Effects of chitosan, aqueous extract of ginger, onion and garlic on quality and shelf life of stewed-pork during refrigerated storage. *Food Chemistry* 141 (3): 1655-1660.

Cheng, A., Chen, X., Jin, Q., Wang, W., Shi, J. and Liu, Y. 2013. Comparison of Phenolic Content and Antioxidant Capacity of Red and Yellow Onions. *Czech Journal of Food Sciences* 31 (5): 501-508.

Chew, K. K., Khoo, M. Z., Ng, S. Y., Thoo, Y. Y., Wan Aida, W. M. and Ho, C. W. 2011. Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of *Orthosiphon stamineus* extracts. *International Food Research Journal* 18 (4): 1427-1435.

Chirinos, R., Rogez, H., Campos, D., Pedreschi, R. and Larondelle, Y. 2007. Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruíz and Pavón) tubers. *Separation and Purification Technology* 55 (2): 217-225.

Dai, J. and R. J. Mumper. 2010. Plant Phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 10 (15): 7313-7352.

Dziri, S., Hassen, I., Fatnassi, S., Mrabet, Y., Casabianca H., Hanchi, B. and Hosni, K. 2012. Phenolic constituents, antioxidant and antimicrobial activities of rosy garlic (*Allium roseum var. odoratissimum*). *Journal of Functional Foods* 4 (2): 423-432.

Giusti, M. M. and Wrolstad, R. E. 2001. Anthocyanins. Characterization and Measurement with UV-Visible Spectroscopy. In Wrolstad, R. E. (Ed.). *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, p. 1-13. New York: John Wiley and Sons.

Jayanthi, P. and Lalitha, P. 2011. Reducing power of the solvent extracts of *Eichhornia Crassipes* (Mart.) Solms. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 3 (3): 126-128.

Khattree, R. and Naik, D. N. 2000. Multivariate data reduction and discrimination with SAS software Cary, p. 558. USA: SAS Institute Inc.

Khiari, Z., Makris, D. P. and Kefalas, P. 2009. An investigation on the recovery of antioxidant phenolic from onion solid wastes employing water/ethanol-based solvent systems. *Food Bioprocess Technology* 2 (4): 337-343.

Kiassos, E., Mylonaki, S., Makris, D. P. and Kefalas, P. 2009. Implementation of response surface methodology to optimise extraction of onion (*Allium cepa*) solid waste phenolics. *Food Science and Emerging Technologies* 10 (2): 246-252.

Lachman, J., Pronek, D., Hejtmánková, A., Dudjak, J., Pivec, V. and Faitová, K. 2003. Total polyphenol and main flavonoid antioxidants in different onion (*Allium cepa* L.) varieties. Horticultural Science 30 (4): 142-147.

Lanzotti, V. 2006. The analysis of onion and garlic. Journal of Chromatography 1112 (1-2): 3-22.

Liyana-Pathirana, C. and Shahidi, F. 2005. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. Food Chemistry 93 (1): 47-56.

Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Dominguez, J. M., Sineiro, J., Dominguez, H., Núñez, M. J. and Parajó, J. C. 2001. Natural antioxidants from residual sources. Food Chemistry 72 (2): 145-171.

Najjaa, H., Zerria, K., Fattouch, S. and Ammar, E. 2011. Antioxidant and Antimicrobial activities of *Allium roseum* L. "Lazoul", a wild edible endemic species in North Africa. International Journal of Food Properties 14 (2): 371-380.

Negri, M. L. S., Possamai, J. C. and Nakashima, T. 2009. Antioxidant activity of "espinheira-santa" - *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., leaves dried in different temperatures. Revista Brasileira de Farmacognosia 19 (2): 553-556.

Nuutila, A. M., Kammiovirta, K. and Oksman-caldentey, K. M. 2002. Comparison of methods for the hydrolysis of flavonoids and phenolic acids from onion and spinach for HPLC analysis. Food Chemistry 76 (4): 519-525.

Nuutila A. M., Puupponen-Pimia R., Arni M. and Oksman-Caldentey K. M. 2003. Comparison of antioxidant activities of onion and garlic extracts by inhibition of lipid peroxidation and radical scavenging activity. *Food Chemistry* 81(4): 485-493.

Porter, W. L. 1993. Paradoxical behavior of antioxidants in food and biological systems. *Toxicology Industrial Health* 9 (1-2): 93-122.

Pulido, R., Bravo, L. and Saura-Calixto, F. 2000. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (8): 396-402.

Roesler, R., Malta, L. G., Carrasco, L. C., Holanda, R. B., Sousa, C. A. S. and Pastore, G. M. 2007. Antioxidant activity of cerrado fruits. *Food Science and Technology* 27 (1): 53-60.

Roldán, E., Sánchez-Moreno, C., De Ancos, B. and Cano M.P. 2008. Characterisation of onion (*Allium cepa* L.) by-products as food ingredients with antioxidant and antibrowning properties. *Food Chemistry* 108 (3): 907-916.

Su, C. S. and Chen, Y. P. 2007. Correlation for the Solubilities of Pharmaceutical Compounds in Supercritical Carbon Dioxide. *Fluid Phase Equilibria* 254 (1-2): 167-173.

Tan, M. C., Tan, C. P. and Ho, C. W. 2013. Effects of extraction solvent system, time and temperature on total phenolic content of henna (*Lawsonia inermis*) stems. *International Food Research Journal* 20 (6): 3117-3123.

Thoo, Y. Y., Ng, S. Y., Khoo, M. Z., Wan Aida, W. M. and Ho, C. W. 2013. A binary solvent extraction system for phenolic antioxidants and its application to the estimation of antioxidant capacity in *Andrographis paniculata* extracts. *International Food Research Journal* 20 (3): 1103-1111.

Wiczowski, W., Romaszko, J., Bucinski, A., Szawara-Nowak, D., Honke, J., Zielinski, H. and Piskula, M. K. 2008. Quercetin from shallots (*allium cepa l. var. aggregatum*) is more bioavailable than its glucosides. *Journal of Nutrition* 138 (5): 885-888.

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

Table 1. Total phenolic, flavonoids and anthocyanins content of dry onion skin.

Solvent, %	Time, min				Mean or Equation	P-value		
	30	60	120	240		S	T	S×T
	Total phenolics, mg GAE/g dry onion skin					0.001	0.078	0.0003
20	311.0	113.4 ^B	156.4 ^B	138.2 ^B	179.8		Tendency	
40	367.3	188.4 ^B	338.0 ^{AB}	91.9 ^B	246.4		L	Q
60	404.2	309.0 ^B	585.1 ^A	549.2 ^A	461.8	S	0.001	0.7378
80	300.1 ^b	649.5 ^{Aa}	640.8 ^{Aa}	608.4 ^{Aab}	549.7	T	0.635	0.0602
Mean or Equation	345.6	315.1	430.1	346.9				
	Total flavonoids, mg QE/g dry onion skin					0.001	0.064	0.0048
20	22.7 ^C	22.6 ^B	22.6 ^B	22.8 ^C	22.7		Tendency	
40	26.7 ^{BC}	26.9 ^B	29.0 ^{AB}	27.3 ^{BC}	27.2		L	Q
60	36.2 ^{Aab}	40.9 ^{Aa}	33.3 ^{Ab}	32.2 ^{ABb}	35.6	S	0.001	0.0021
80	31.4 ^{AB}	37.4 ^A	35.2 ^A	38.1 ^A	35.5	T	0.828	0.5488
Mean or Equation	29.3	31.9	29.8	30.1				
	Total anthocyanins, mg cyanidin 3-O-glucoside /100g dry onion skin					0.001	0.001	0.0001
20	73.5 ^B	66.5 ^C	55.5 ^C	73.8 ^B	67.3		Tendency	
40	104.3 ^{AB}	127.7 ^{BC}	125.9 ^{BC}	117.0 ^{AB}	118.7		L	Q
60	227.7 ^{Ab}	470.2 ^{Aa}	217.7 ^{ABb}	217.0 ^{Ab}	283.2	S	0.0001	0.0010
80	221.1 ^A	202.1 ^B	309.1 ^A	233.4 ^A	241.4	T	0.233	0.1161
Mean or Equation	156.6	216.6	177.0	160.3				

Means with the same small letter in the row do not differ ($P>0.05$) by Tukey test.

Means with the same capital letter in the column do not differ ($P>0.05$) by Tukey test.

GAE = Gallic acid equivalent; QE: Quercetin equivalent; S: solvent; T: time; L: linear; Q: quadratic; p -value: probabilistic value; CV (%): coefficient of variation; SEM: standard error of the mean

CV (phenolics) = 58.8; CV (flavonoids) = 21.0; CV (anthocyanins) = 63.3

SEM (phenolics) = 30.5; SEM (flavonoids) = 0.9; SEM (anthocyanins) = 16.2

Table 2. Antioxidant activities of dry onion skin.

Solvent, %	Time, min				Mean or Equation	P-value		
	30	60	120	240		S	T	SxT
Ferric reducing activity (FRAP), $\mu\text{mol TEAC/g}$ dry onion skin						0.0001	0.1480	0.0001
20	18.3 ^B	12.5 ^C	14.4 ^B	21.0 ^C	16.5	Tendency		
40	27.0 ^B	27.3 ^{CB}	28.1 ^B	24.3 ^{BC}	26.7	L	Q	
60	120.6 ^{Aab}	152.5 ^{Aa}	101.5 ^{Abc}	64.8 ^{ABc}	109.9	S	0.0001	0.0001
80	54.2 ^{Bb}	60.5 ^{Bb}	108.5 ^{Aa}	97.6 ^{Aab}	80.2	T	0.2617	0.0580
Mean or Equation	55.0	63.2	63.1	51.9				
DPPH radical-scavenging activity, $\mu\text{mol TEAC/g}$ dry onion skin						0.0001	0.3123	0.0663
20	28.8	27.3	22.2	26.4	26.2 ^B	Tendency		
40	33.1	30.2	44.4	50.0	39.4 ^B	L	Q	
60	61.4	35.9	83.6	100.1	70.2 ^A	S	0.0001	0.8588
80	97.4	81.3	95.4	50.2	81.1 ^A	T	0.4435	0.6547
Mean or Equation	55.2	43.7	61.4	56.7				
IC₅₀ % inhibition of DPPH radical, mg/mL						0.0001	0.2440	0.0047
20	1.9 ^{AB}	2.7 ^A	2.4 ^A	2.4 ^A	2.4	Tendency		
40	2.5 ^{Aa}	1.6 ^{ABab}	1.3 ^{ABab}	1.1 ^{Bb}	1.6	L	Q	
60	1.0 ^{BC}	1.2 ^B	0.6 ^B	0.5 ^B	0.9	S	0.0001	0.0034
80	0.6 ^C	0.7 ^B	0.9 ^B	1.1 ^B	0.8	T	0.0780	0.5318
Mean or Equation	1.5	1.6	1.3	1.3				
β-Carotene bleaching inhibition activities, % (12.5 mg/mL)						0.0001	0.8288	0.0001
20	49.9 ^a	24.8 ^{Bab}	25.7 ^{Bab}	11.1 ^{Cb}	27.9	Tendency		
40	57.5	60.8 ^A	52.7 ^A	49.6 ^B	55.1	L	Q	
60	75.2	67.0 ^A	73.4 ^A	84.2 ^A	74.9	S	0.0001	0.0001
80	55.9 ^b	77.4 ^{Aab}	74.0 ^{Aab}	85.7 ^{Aa}	73.2	T	0.6834	0.4202
Mean or Equation	59.6	57.5	56.4	57.7				

Means with the same small letter in the row do not differ ($P > 0.05$) by Tukey test. Means with the same capital letter in the column do not differ ($P > 0.05$) by Tukey test. TEAC = trolox equivalent antioxidant capacity; S: solvent; T: time; L: linear; Q: quadratic; p -value: probabilistic value; CV (%): coefficient of variation; SEM: standard error of the mean. CV (FRAP) = 77.5; CV (DPPH) = 62.2; CV (IC₅₀) = 56.2; CV (β -Carotene) = 39.0 SEM (FRAP) = 6.5; SEM (DPPH) = 4.9; SEM (IC₅₀) = 0.1; SEM (β -Carotene) = 3.3

Table 3. Pearson correlation coefficients

	TPC	TFC	FRAP	IC ₅₀	DPPH	BCB	ANT
TPC		0.66***	0.51***	-0.53**	0.56***	0.69***	0.48***
TFC			0.82***	-0.68***	0.51***	0.75***	0.85***
FRAP				-0.55***	0.39**	0.65**	0.84***
IC ₅₀					-0.76***	-0.72***	-0.56***
DPPH						0.50***	0.39**
BCB							0.57***
ANT							

^{ns}no significant difference ($p>0,05$); *significant difference ($p<0,05$); **significant difference ($p<0,01$); ***significant difference ($p<0,001$).

TPC: total phenolic content; TFC: total flavonoid content; FRAP: Ferric reducing antioxidant power; IC₅₀: inhibition activity; DPPH: DPPH assay; BCB: β -carotene bleaching assay; ANT: Total anthocyanins.

MANUSCRITO 2

**FOCUSED MICROWAVE-ASSISTED EXTRACTION TO OBTAIN
BIOACTIVE COMPOUNDS IN RED ONION SKIN (*Allium cepa* L.)**

Artigo enviado para Revista Food Chemistry
(Formatado conforme as normas da revista)

ORIGINAL ARTICLE

Focused microwave-assisted extraction to obtain bioactive compounds in red onion skin*(Allium cepa L.)*

Vanessa Bordin Viera*^a; Natiéli Piovesan^a; Renius de Oliveira Mello^a; Tiffany Prokopp Hautrive^a; Roberto Christ Vianna Santos^b; Juliano Smanioto Barin^a; Cesar Augusto Bizzi^c;
Ernesto Hashime Kubota^a

^aDepartamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, Santa Maria/RS/Brasil.

^bDepartamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Santa Maria/RS/Brasil.

^cDepartamento de química, Centro de Ciências Naturais, Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, Santa Maria/RS/Brasil. Emails: vanessa.bordinviera@gmail.com; natipiovesan@bol.com.br; reniusmello@gmail.com; tiffanyhautrive@yahoo.com.br; robertochrist@gmail.com; juliano@ufsm.br; c_bizzi@yahoo.com.br; ernestokubota@smail.ufsm.br

*Corresponding author: Av. Roraima n° 1000, Prédio 42, Cidade Universitária, Bairro Camobi, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil, Phone: +55 55 3220 8254, e-mail: vanessa.bordinviera@gmail.com

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the content of phenolic compounds, total flavonoids and anthocyanins, as well as antioxidant and antimicrobial activity of red onion peel extract obtained by focused microwave extraction using different temperatures (30, 50, 60 and 70 °C) and ethanol concentrations (20, 40, 60 and 80%). The antioxidant activity of the extracts was evaluated using the following methods: DPPH radical sequestration; inhibition of auto-oxidation of β -carotene system; ABTS and FRAP. The antimicrobial activity was evaluated by the disk diffusion method. The extracts with the highest content of phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity were obtained using 60 and 80% solvents, and at higher temperatures. In terms of the antioxidant activity, β -carotene and IC_{50} , the extraction temperature had an influence in relation to the solvent concentrations of 20, 40 and 60%, while the temperature of 70 °C provided the best extract. The values for total anthocyanins, DPPH and FRAP methods suffered no significant influence at the temperatures. The absence of antimicrobial and antifungal activity in the red onion skin extracts was verified. It can be said that the red onion peel is a good source of bioactive compounds with antioxidant activity can be used as functional ingredient in several products.

Keywords: red onion skin, antimicrobial, antioxidant activity, bioactive compounds.

1. Introduction

The onion (*Allium cepa* L.) is a versatile vegetable from the Allium family that is appreciated throughout the world not only for its taste but also because it is a significant source of many beneficial compounds. Studies have revealed the presence of various flavonoids in different varieties of onions, along with other bioactive compounds (Lachman, Pronek, Hejtmánková,

Dudjak, Pivic & Faitová, 2003), almost all of which are located primarily in the skin. Wiczowski, et al., (2008) found a higher concentration of quercetin in onion skin compared with the fleshy part. Nuutila, Kammiovirta & Oksman-Caldentey (2002) showed that onion skin extracts had high antioxidant capacity.

Various methods have been used to extract bioactive compounds in recent times, in an attempt to improve the efficiency and the quality of extracts, as well as to reduce the extraction time and amount of solvent used. Focused microwave extraction is a relatively new method by which microwave energy is used to heat polar solvents in contact with solid samples and to partition compounds of interest between the sample and the solvent, thereby reducing the extraction time and the consumption of solvent (Pérez-Serradilla & Luque de Castro, 2011). This method also produces higher extraction rates and improved results at lower costs (Gallo, Ferracane, Graziane, Ritiene & Flogiano, 2010). However, no information has yet been provided regarding the application of focused microwave radiation for the extraction of bioactive compounds in red onion skin.

The aim of this study was to determine the content of phenolic compounds, total flavonoids and anthocyanins, as well as the antioxidant and antimicrobial activity of red onion skin extract (*Allium cepa* L.), which was obtained by focused microwave extraction at different temperatures and using different concentrations of solvent.

2. Materials and methods

2.1. Raw materials

Red onions (*Allium cepa* L.) were acquired from commercial premises located in the city of Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. The onions were selected for the absence of defects, pests and diseases. The surfaces were washed with mild detergent to remove dirt and the onions

were rinsed in running water. The onions were sanitized with 200 mg.L⁻¹ of sodium hypochlorite for 20 min and then the onions were peeled manually with stainless steel knives. The skins were placed in trays and taken to a focused circulating air oven (Marconi, MA-035/100, Piracicaba, Brazil) where they were kept at 50 °C for 24 hours. The skins were subsequently ground in an analytical mill that was cooled to 4 °C (Quimis, Q298A21 model, Brazil) with the aid of an ultrasonic thermostatic bath (Solab, SL-152/10 model) and stored in amber flasks at a temperature of -18 °C to obtain the extracts.

2.2. Extraction by focused microwave-assisted radiation

The extraction was performed according to procedures described by Pellati, Prencipe, Bertelli & Benvenuti, (2013) with modifications. A focused radiation microwave oven with two cavities was used, which was equipped with glass vials with a capacity of 180 mL (Star System 2, 800 W, CEM, Matthews, N.C, USA). The previously milled red onion skin was weighed and transferred to the glass vials of the microwave oven, and solvent grain alcohol was added at a ratio of 1:20 (w/v). The samples were subjected to the effect of microwave using the following different parameters: solvent concentration (20%, 40%, 60% and 80% v/v of grain alcohol), temperature (30, 50, 60 and 70 °C) during a period of 20 minutes.

The extracts were filtered through qualitative filter paper and centrifuged at 3000 rpm for 15 min. The supernatants were collected, packaged in amber flasks, and stored in a freezer (-18 °C) until analysis. All the extractions were performed in triplicate.

2.3. Determination of total phenolic compounds (TPC)

In order to estimate the total phenolic compounds, the methodology described by Roesler, Malta, Carrasco, Holanda, Sousa & Pastore (2007) was used. Briefly, 200 µL of extract was

mixed with 1000 μL of a 1:10 diluted Folin–Ciocalteu reagent. The solutions were mixed thoroughly and incubated at room temperature (27 °C) for 5 min. After incubation, 800 μL of 7.5% sodium carbonate (Na_2CO_3) solution was added and again incubated in water bath at 50 °C for 5 min. The absorbance of the reaction mixtures were measured at 765 nm using a spectrophotometer (SP-220 Biospectro brand, São Paulo, Brazil). The absorbance of the extract was compared with a gallic acid standard curve ($y=0.0012x-0.0025$; $R^2= 0.99$) for estimating concentration of TPC in the sample. The TPC was expressed as mg of gallic acid equivalents (GAE) per gram of powder on dry weight (DW) basis.

2.4. Determination of total flavonoids

The total flavonoid content was measured using the colorimetric assay developed by Zhishen, Mengcheng & Jianming (1999). A known volume (0.5 mL) of the extract was added to a test tube and at zero time, 150 μL of 5% NaNO_2 was added. After 5 min, 150 μL of 10% AlCl_3 was added, and, after 6min, 1 mL of 1 M NaOH, followed by the addition of 1.2 mL distilled water. Sample absorbance was read at 510 nm using a spectrophotometer (SP-220 Biospectro brand, São Paulo, Brazil). The absorbance of the extract was compared with a quercetin standard curve ($y= 0.0027x-0.0772$; $R^2=0.96$) for estimating concentration of flavonoids contents in the sample. The flavonoids contents was expressed as mg of quercetin equivalents (QE) per gram of powder on dry weight (DW) basis.

2.5. Determination of total anthocyanin content

The content of anthocyanins was determined by the pH-differential method (Giusti & Wrolstad, 2001). Each extract (0.5 mL) was diluted with 2.5 mL of 0.025M potassium chloride buffer, pH 1.0 and 0.4M sodium acetate buffer, pH 4.5, separately. The diluted solutions were

then left at room temperature for 15 min, and the absorbance of each dilution was read at 520 and 700 nm against a blank cell filled with distilled water. The anthocyanin content was calculated using the following equation 1:

$$\text{Anthocyanins content}_{(\text{mg}/100\text{g of dry matter})} = A \times MW \times DF \div (\varepsilon \times W)(1)$$

Where: A = absorbance ($A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}}$)_{pH1.0} - ($A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}}$)_{pH4.5}, MW= molecular weight of cyaniding-3-glucoside ($\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{O}_6$, 449.2), DF = dilution factor, ε =molar absorptivity (26900), and W= sample weight (g).

2.6. Antioxidant activity – FRAP method

The FRAP method was performed according to Benzie & Strain (1996), with modifications proposed by Pulido, Bravo & Saura-Calixto (2000). In this assay, 3.6 mL of FRAP reagent (0.3 M, pH 3.6 acetate buffer, 10 mM TPTZ and 20 mM ferric chloride) were mixed with 200 μL of extract diluted in distilled water, being incubated for 30 min at 37 °C. The FRAP solution was used as reference reagent, and absorbance was read at 593 nm of the extract was compared with trolox standard curve ($y= 0.0601x-0.0679$; $R^2=0.99$) for estimating concentration of antioxidant activity contents in the sample. The results were expressed in μmol of trolox equivalents per gram of powder on dry weight (DW) basis ($\mu\text{mol TE/g}^{-1}$).

2.7. Antioxidant activity – DPPH method

The radical scavenging activity of the extracts against DPPH radical was measured using the method of Brand-Williams, Cuvelier & Berset (1995), modified as follow: an aliquot (0.5 mL) of methanolic solution containing different concentrations were added to 2.5 mL of methanol DPPH solution (0.1 mM). The mixture was shaken gently and left to stand at room

temperature in the dark for 30 min. After incubation, readings were taken of the samples using a spectrophotometer (SP-220, Biospectro brand, São Paulo, Brazil) at a wavelength of 517 nm.

The scavenging activity was measured as the decrease in absorbance of the samples versus DPPH standard solution. Results were expressed as radical scavenging activity percentage (%) of the DPPH radical, according to Equation 2:

$$\%DPPH_{radical\ scavenging} = [(A_0 - A_s) \div A_0] \times 100 \quad (2)$$

Where A_0 is the absorbance of the control and A_s is the absorbance of the sample. The effective concentration having 50% radical inhibition activity (IC_{50}), expressed as mg extract/mL, was determined from the graph of the free radical scavenging activity (%) against the extract concentration.

2.8. Antioxidant activity – ABTS method +

The ABTS method was carried out according to the methodology described by Re, Pellegrini, Proteggente, Pannala, Yang & Rice-Evans (1999), with modifications. The ABTS radical was formed from the reaction of 140 mM potassium persulfate with 7 mM ABTS stock solution, kept in the dark and at room temperature for 16 h. For the analysis, ABTS radical was diluted in distilled water until a solution with absorbance of $700 \text{ nm} \pm 0.02 \text{ nm}$ at 734 nm was obtained. A 30 μL aliquot of each extract was then homogenized with 3 mL of the ABTS radical. Absorbance of the samples was read at 734 nm after 6 min of reaction. The results were expressed in μmol of trolox equivalent per gram of powder on dry weight (DW) basis ($\mu\text{mol TE/g}^{-1}$).

2.9. Antioxidant activity- β -Carotene bleaching assay

The assay was performed as described by Cao et al. (2009), with some modifications. In brief, 0.01g of β -carotene dissolved in 10 mL of chloroform was mixed with 40 mg of linoleic acid and 400 mg of Tween 40 in a flask. After removing chloroform in a rotary vacuum evaporator at 40 °C for 10 min, 100 mL of oxygenated distilled water was added slowly to the oily residue with vigorous agitation to form an emulsion. A 4.5 mL aliquot of the emulsion was added to a tube containing 0.5 mL of extract sample solution of different concentration and the absorbance was measured immediately at 470 nm against a blank consisting of the emulsion without β -carotene. The tubes were placed in a water bath at 50 °C, and the oxidation of the emulsion was monitored spectrophotometrically by measuring the absorbance at 470 nm for every 15 min until 120 min had passed. The antioxidant activity (AA) of the sample extract was evaluated in terms of the bleaching of β -carotene using the following equation 3:

$$\text{Inhibition \%} = [(A_t - C_t) \div (C_o - C_t)] \times 100 \quad (3)$$

where A_t and C_t are the absorbance values of the test sample and control, respectively, after a certain time (t) of incubation and C_0 is the absorbance value for the control, measured at the beginning of the experiments.

2.10. Determination of in vitro antimicrobial activity

The red onion skin extracts were individually tested against *Escherichia coli* ATCC 25922, *Shigella flexneri* ATCC 12022, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Pseudomonas aeruginosa* PA01, *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708, *Salmonella enteritidis* clinical isolate, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Bacillus cereus* ATCC 9634, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35985, *Enterococcus faecium* ATCC

6569, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Streptococcus* sp clinical isolate, *Candida kefyr* ATCC 66028 and *Saccharomyces cerevisiae* (environmental isolate).

For the disk diffusion technique, suspensions of microorganism were prepared in 0.9% NaCl solution and compared to the turbidity of 0.5 on the Mcfarland scale (equivalent to approximately 1.5×10^8 colony forming units/mL). Using sterile swabs, the bacterial suspensions were sown on the surface of Petri dishes containing about 15 mL of Mueller-Hinton agar with a thickness of approximately 4 mm.

Sterilized filter paper disks, six mm in diameter, containing 10 μ L of distinct compounds were placed on the surface of the plates in contact with the inoculum of the microorganism. The plates were incubated at 37 °C for 24 hours (for the bacteria) and for 48 hours at 25 °C (for the fungi) in an oven. After the incubation time, the formation of halos was analyzed. The tests were performed in triplicate and the results were expressed in mm as the arithmetic average of the diameter of the inhibition halos that were formed around the disks. The following were used as inhibition controls: ketoconazole 50 μ g (Biorad) for fungi; polymyxin 300 units (Biorad) for gram- negatives; and vancomycin 30 μ g for gram-positives.

2.11. Statistical analysis

The results were submitted to analysis of variance (ANOVA). The means were set by the method of ordinary least squares and compared by Tukey's test at a significance level of 5% ($p < 0.05$). Regardless of the significance of the interactions, the trends were tested via contrasts from the coefficients for the interpolation of the orthogonal polynomials. Additionally, descriptive statistics and Pearson's correlation coefficient between variables were performed. The

statistical analyses were conducted using the SAS[®] application (Statistical Analysis System), version 9.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) (Khattree & Naik, 2000).

3. Results and discussion

3.1. Total phenolic compounds, anthocyanins and total flavonoids

Table 1 shows the means values for the content of total phenolic compounds, flavonoids and anthocyanins for red onion skin extracts obtained by the focused microwave method using different concentrations of solvent and extraction temperatures.

There was an interaction ($P < 0.05$) between the solvent and the extraction temperature for total phenolics. The total phenolic content presented behavior with a linear trend ($P < 0.05$), which increased as the concentration of solvent was increased to temperatures of 60 and 70 °C. No difference was verified ($P > 0.05$) between the concentrations at 60 and 80%. However, at 30 and 50 °C the total phenolic values were invariant ($P > 0.05$) as a function of solvent concentration.

The extraction temperature influenced ($P < 0.05$) the values for total phenolics in relation to the solvents at 60 and 80%. The extract with the highest total phenolic content was obtained at 70 °C but there was no significant difference between the temperatures of 50, 60 and 70 °C. It was found that above the temperature of 30 °C an increase in temperature caused an increase in total phenolic content, which demonstrated a linear trend. A similar result was found by Bubalo, Natka, Tomasevic, Ganic & Redovnikovic (2016), who performed microwave extraction to determine the total phenolics in grape skin at different extraction temperatures (50, 65, 80 and 90 °C); the highest content of total phenolics was found at 65 °C. There are many studies about the use of microwave to extract bioactive compounds from various plants. These studies have varying operation parameters (time, temperature, solvent, etc.) and they often have conflicting

findings regarding the optimal conditions for extraction (Jokic et al., 2012; Song, Li, Liu & Zang, 2011).

In the present study, the total flavonoid contents were not influenced ($P > 0.05$) by the interaction between the solvent concentration and the extraction temperature. However, the values increased and presented linear behavior ($P < 0.05$) as the concentration of the solvent was increased; no difference ($P > 0.05$) was observed between the solvents of 60 and 80%. According to Hemwimon, Pavasant & Shotipruk (2007) the polarity of the solvent and the dielectric constant of the mixture increases with the addition of water, and the increase of the dielectric constant allows the solvent mixture to absorb more microwave energy. However, the addition of water causes a decrease in the dissipation factor of the mixture, resulting in lower efficiency in heat dissipation and consequently lower extraction. This factor may explain the increase in extraction that occurred with more concentrated solvent in the present study.

The same behavior could be seen in relation to the extraction temperature, which did not differ ($P > 0.05$) in the total flavonoid values between extraction temperatures of 50, 60 and 70 °C. Dhobi, Mandal & Hemalatha (2009) stated that during extraction the microwaves increase the temperature due to dipole rotation; consequently at a higher temperature the solubility of the bioactive compounds are increased and the viscosity of the extracts reduced, thus accelerating the dissolution and release of these compounds. However, Cunningham, McMinn & Magel (2008) stated that high temperatures may lead to the degradation of certain bioactive compounds. Consequently, in the present study 70 °C was defined as the highest temperature in order to avoid the loss of bioactive compounds, to minimize the adverse effects of processing, and to reduce costs.

In contrast, the total anthocyanin content was not affected ($P > 0.05$) by different extraction temperatures. However, the total anthocyanin content increased linearly with increases

in the concentration of solvent, and showed no difference ($P > 0.05$) between the concentrations of 60 and 80%.

3.2. Antioxidant activity – FRAP, DPPH, β -carotene and ABTS methods

Due to the complex reactions involved in antioxidant activity it should not be evaluated by a single method. For this reason, the antioxidant activity of the red onion skin extracts was evaluated by different methods, i.e. FRAP, ABTS, DPPH, IC_{50} calculated and β -carotene (Table 2).

The antioxidant activity evaluated by the methods FRAP and DPPH methods ranged from 18.6 to 129.1 and 28.7 to 154.9 respectively (Table 2). There was no interaction ($P > 0.05$) between the solvent concentration and the extraction temperature for the FRAP and DPPH antioxidant activity. The values increased linearly with increases in solvent concentration and there was no difference ($P > 0.05$) between the concentrations of 60 and 80% for DPPH. However, for the FRAP values, the 80% solvent resulted in an extract with a higher antioxidant capacity. Milutinovic, Radonanovic, Corovic, Siler-Marinkovic, Rajilic-Stojanovic & Dimitrijevic-Brankovic (2015), used microwave to extract bioactive compounds from plant residues of *Achillea millefolium* L. Using different solvent concentrations (60, 70 and 80%) they found that the extract with the highest antioxidant activity by the DPPH method was found using 76% solvent. Using the FRAP method the extract with the highest antioxidant activity was found using 73% solvent, which was similar to the findings of the present study. The extraction temperatures did not influence ($P > 0.05$) the FRAP and DPPH antioxidant activity values.

The IC_{50} values (the concentration capable of reducing DPPH by 50%) ranged from 0.3 to 1.4 mg/ml (Table 2). According to Arbos, Freitas, Stertz & Dornas (2010), the lower the IC_{50} value the higher the antioxidant activity, and values above 25 mg/ml are considered to have low

antioxidant potential. Interaction ($P < 0.05$) between the solvent and the extraction temperature in relation to the IC_{50} was verified. The IC_{50} values were low ($P < 0.05$) with increasing solvent concentration, presenting behavior with a linear trend in relation to temperature. At temperatures of 30, 50 and 70 °C it could be seen that the IC_{50} values did not differ in relation to solvent concentrations of 40, 60 and 80%. At a temperature of 60 °C, the IC_{50} values did not differ ($P > 0.05$) from each other at solvent concentrations of 60 and 80%. It was found that using solvent concentrations of 60 and 80% it was possible to obtain an extract with low IC_{50} values. The extraction temperature only had an influence using 40% solvent, indicating that the extracts with better IC_{50} values were obtained at 50 and 70 °C, which did not statistically differ from each other. In relation to the other solvent concentrations, the extraction temperature did not affect the inhibitory capacity of the extracts.

Table 2 shows that the red onion skin extracts were able to inhibit the oxidation of linoleic acid at a concentration of 12.5 mg/ml, with values ranging from 34.8 to 92.7%. There was interaction ($P < 0.05$) between the solvent concentration and the extraction temperature for β -carotene. The values for β -carotene showed a linear trend that increased in line with increases in the concentration of the solvent at temperatures of 30 and 50 °C. However, the values found for solvents at concentrations of 40, 60 and 80% had no difference ($P > 0.05$) between them. At extraction temperatures of 60 and 70 °C the concentration of solvent did not significantly influence the β -carotene values.

The interaction ($P < 0.05$) between temperature and solvent concentration was shown to have significant difference at a solvent concentration of 20%, indicating that an increase in temperature caused an increase in β -carotene values, although there was no difference ($P > 0.05$) between the temperatures of 50, 60 and 70 °C. For the other solvent concentrations (40, 60 and

80%) the β -carotene values did not differ ($P>0.05$) between each other at the extraction temperatures that were studied.

The antioxidant capacity determined by the ABTS method ranged from 12.6 to 57.5 $\mu\text{mol TEAC/g}$ of dry red onion skin. There was an interaction ($P < 0.05$) between the solvent concentration and extraction temperature for the ABTS antioxidant activity values. The antioxidant activity values presented behavior with a quadratic trend ($P < 0.05$) at temperatures of 30 and 70 $^{\circ}\text{C}$, indicating extracts with higher antioxidant activity, with no difference ($P > 0.05$) between them at solvent concentrations of 60 and 80%. The temperature presented quadratic behavior ($P < 0.05$) only for the concentration obtained using 60% solvent. The extract obtained at 70 $^{\circ}\text{C}$ showed different antioxidant activity ($P < 0.05$) only for the extract obtained at 50 $^{\circ}\text{C}$. In relation to the other solvent concentrations, the antioxidant activity values showed no difference ($P > 0.05$) between the temperatures.

The correlation between antioxidant activity and bioactive compounds (total phenols, flavonoids and anthocyanins) has been widely studied (Aviram & Aviram, 2002; Pyo, Lee, Logendra & Rosen, 2004; Sanchez-Moreno, Plaza, Ancos & Cano, 2003). Nuutila, Puupponen-Pimia, Aarni & Oksman-Caldentey (2003) found a correlation between a high capacity for radical scavenging/antioxidant activity and high amounts of phenolic compounds and flavonoids in onion extracts, verifying that the bioactive compounds of plants from the *Allium* family contribute to their antioxidant properties. Furthermore, these authors showed that the extracts from onion skin showed the highest level of antioxidant activity. In the present study a correlation between antioxidant capacity and bioactive composition was also evident. It was found that the antioxidant activity values (FRAP, DPPH, ABTS, IC_{50} and β -carotene) had a correlation with the total phenolics ($r=0.71$; $r=0.66$; $r=0.56$; $r=-0.59$ and $r=0.45$; $p < 0.001$), total

flavonoids ($r=0.84$; $r=0.74$; $r=0.63$; $r=-0.77$ and $r=0.63$; $p<0.001$) and total anthocyanins ($r=0.79$; $r=0.78$; $r=0.62$; $r=-0.72$ and $r=0.59$; $p<0.001$) respectively.

The results of this study demonstrated that the conditions that favored the maximum extraction of phenolics, flavonoids and anthocyanins were the same as for the extracts with higher antioxidant capacity. Therefore, the extracts obtained using higher solvent concentrations (60 and 80%) and higher temperatures showed increased extraction of bioactive compounds, which resulted in extracts with higher antioxidant activity.

As regards the type of raw material that was used (red onion skin), soluble phenolic compounds are generally located in compartments within the cell vacuoles, in free form or conjugated. Insoluble phenolic compounds are linked to cell wall structures, which require higher temperatures for extraction, as was seen in the present study. The action of the focused microwave, together with direct heating, was able to penetrate the matrix of the onion skin and interact with polar molecules (ethanol solvent and total phenolics etc.) enabling the radiation to be absorbed with increased intensity, which resulted in increased internal pressure that caused the rupture of the cell walls and the release of bioactive substances.

3.3. Antimicrobial activity

The antimicrobial activity of red onion skin extract, which was subjected to focused microwave radiation extraction at varying temperatures and using different solvent concentrations on Gram-positive bacteria, Gram-negative bacteria and fungi are shown in Table 3.

No activity was found in relation to Gram-positive bacteria, Gram-negative bacteria and fungi in all the red onion skin extracts that were tested. Other reported data regarding antibacterial activity are contradictory to our results (Najjaa, Zerria, Fattouch & Ammar, 2011).

These authors reported strong antibacterial activity against *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus* and *Staphylococcus aureus*, from *Allium roseum* extract, which belong to the same family of red onion. Dziri et al. (2011) showed the antimicrobial activity of pink garlic extract (*Allium roseum* var. *Odoratissimum*) in relation to *Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. Boo, Hwang, BAE, Park, Heo & Gorinstein (2012) investigated different natural pigments and found low antimicrobial activity in onion skin (*Allium cepa* L.) in relation to *Escherichia coli*; the majority of the other pigments showed high antimicrobial activity against this bacteria.

Despite the fact that red onion peel extracts contain a high content of total phenolics, flavonoids and anthocyanins, antimicrobial activity does not seem to be closely related to these pigments. The cause of these reported different results may be the result of many differences, such as the extraction process and the source of the tested plants and micro-organisms. However, our findings reported the absence of antimicrobial and antifungal activity in red onion skin extracts.

4. Conclusion

In general, the results of this study indicate that the higher concentrations of solvent (60 and 80%) were more effective in the extraction of bioactive compounds, and consequently in obtaining extracts with higher antioxidant capacity. Regarding the extraction temperature, it was found that the extracts with the highest content of flavonoids and phenolic compounds were obtained at 70 °C, although there was no statistical difference at 50 and 60 °C. The β -carotene, IC50 and ABTS antioxidant activities were influenced by the extraction temperature only at solvent concentrations of 20, 40 and 60%, and the extracts with the highest activity were obtained at a temperature of 70 °C. However, the content of total anthocyanins, and the DPPH and FRAP

antioxidant activity of the extracts, were not influenced by the extraction temperature. The absence of antimicrobial and antifungal activity in the red onion skin extracts was verified.

Furthermore, red onion skin extracts can be used as ingredients to prepare products because they are rich in bioactive compounds, have antioxidant activity, and contribute to the reduction of agro-industrial wastes.

Acknowledgments

The authors wish to thank the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES/FAPERGS) for providing a doctoral scholarship to the first named author and also the Industrial and Environmental Chemistry Laboratory at the Department of Chemistry of the Federal University of Santa Maria, RS, Brazil.

References

- Arbos, K. A., Freitas, R. J. S. D., Stertz, S. C., & Dornas, M. F. (2010). Atividade antioxidante e teor de fenólicos totais em hortaliças orgânicas e convencionais. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30(2), 501-506.
- Aviram, R., & Aviram, M. (2002). Onion juice polyphenols inhibits LDL oxidation: Stimulatory effect of juice storage and of the onion outer peel juice. *Free Radical Research*, 36, 69–70.
- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1999). Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology*, (299), 15-27.
- Boo, H. O., Hwang, S. J., Bae, C. S., Park, S. H., Heo, B. G. & Gorinstein, S. (2012). Extraction and characterization of some natural plant pigments. *Industrial Crops and Products*, 40(1), 129-135.

- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Bubalo, M. C., Natka, C., Tomasevic, M., Ganic, M, K & Redovnikovic, I. R. (2016). Green extraction of grape skin phenolics by using deep eutectic solvents. *Food Chemistry*, 200(1), 159-166.
- Cao, L., Si, J. Y., Liu, Y., Sun, H., Jin, W., Li, Z., Zhao, X. H. & Pan, R. L. (2009). Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant properties of *Mosla chinensis* Maxim. *Food Chemistry*, 115(3), 801-805.
- Cunningham, S. E., McMinn, W. A. M., Magee, T. R. A., & Richardson, P. S. (2008). Effect of processing conditions on the water absorption and texture kinetics of potato. *Journal of Food Engineering*, 84(2), 214–223.
- Dhobi, M., Mandal, V & Hemalatha, S., (2009). Optimization of microwave assisted extraction of bioactive flavonolignan–silybinin. *J. Chem. Metrl*, 3(1), 13–23.
- Dziri, S., Hassen, I., Fatnassi, S., Mrabet, Y., Casabianca H., Hanchi, B. & Hosni, K. (2012). Phenolic constituents, antioxidant and antimicrobial activities of rosy garlic (*Allium roseum* var. *odoratissimum*). *Journal of Functional Foods*, 4(2), 423-432.
- Gallo, M., Ferracane, R., Graziane, Z., Ritieni, A & Flogiano, F. (2010). Microwave assisted extraction of phenolic compounds from four different spices. *Molecules*, 15(9), 6365–6374.
- Giusti, M. M. & Wrolstad, R. E. (2001). Anthocyanins. Characterization and Measurement with UV-Visible Spectroscopy. In: Wrolstad, R. E. (Ed.). *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, p. 1-13. New York: John Wiley & Sons.
- Hemwimon, S., Pavasant, P & Shotipruk, A., (2007). Microwave-assisted extraction of antioxidant anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*. *Sep. Purif. Technol.* 54(1), 44–50.

- Jokic, S., Cvjetko, M., Bozic., Đ., Fabek, S., Toth, N., Vorkapic-Furac, J., & Radojic Redovnikovic, I. (2012). Optimization of microwave-assisted extraction of phenolic compounds from broccoli and its antioxidant activity. *International Journal of Food Science and Technology*, 47, 2613–2619.
- Khattree, R. and Naik, D. N. 2000. Multivariate data reduction and discrimination with SAS software Cary, p. 558. USA: SAS Institute Inc.
- Lachman, J., Pronek, D., Hejtmánková, A., Dudjak, J., Pivec, V. & Faitová, K. (2003). Total polyphenol and main flavonoid antioxidants in different onion (*Allium cepa L.*) varieties. *Horticultural Science*, 30(4),142-147.
- Milutinović, M., Radovanović, N., Ćorović, M., Šiler-Marinković, S., Rajilić-Stojanović, M & Dimitrijević-Branković, S. (2015). Optimisation of microwave-assisted extraction parameters for antioxidants from waste *Achillea millefolium* dust. *Industrial Crops and Products*, 77, 333–341.
- Najjaa, H., Zerria, K., Fattouch, S. & Ammar, E. (2011). Antioxidant and Antimicrobial activities of *Allium roseum L.* “Lazoul”, a wild edible endemic species in North Africa. *International Journal of Food Properties*, 14(2),371-380.
- Nuutila, A. M., Kammiovirta, K. & Oksman-caldentey, K. M. (2002). Comparison of methods for the hydrolysis of flavonoids and phenolic acids from onion and spinach for HPLC analysis. *Food Chemistry*, 76(4), 519-525.
- Nuutila, A. M., Puupponen-Pimia, R., Aarni, M., & Oksman-Caldentey, K.-M. (2003). Comparison of antioxidant activities of onion and garlic extracts by inhibition of lipid peroxidation and radical scavenging activity. *Food Chemistry*, 81(4), 485-493.
- Pellati, F., Prencipe, F. P., Bertelli, D & Benvenuti, S. (2013). An efficient chemical analysis of phenolic acids and flavonoids in raw propolis by microwave-assisted extraction combined with

high-performance liquid chromatography using the fused-core technology. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 81(82), 126-132.

Perez-Serradilla, J & Luque de Castro, M. (2011). Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from wine lees and spray-drying of the extract. *Food Chemistry*, 124(4), 1652-1659.

Pyo, Y. H., Lee, T. C., Logendra, L., & Rosen, R. T. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of Swiss chard (*Beta vulgaris subspecies cyclo*) extracts. *Food Chemistry*, 85(1), 19–26.

Pulido, R., Bravo, L. & Saura-Calixto, F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 396-402.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*, 26(9-10), 1231–1237.

Roesler, R., Malta, L. G., Carrasco, L. C., Holanda, R. B., Sousa, C. A. S. & Pastore, G. M. (2007). Atividade antioxidante de frutas do cerrado. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos*, 27 (1), 53-60.

Sánchez-Moreno, C., Plaza, L., de Ancos, B., & Cano, M. P. (2003). Effect of high-pressure processing on health-promoting attributes of freshly squeezed orange juice (*Citrus sinensis L.*) during chilled storage. *European Food Research and Technology*, 216(1), 18-22.

Song, J., Li, D., Liu, C., & Zhang, Y. (2011). Optimized microwave-assisted extraction of total phenolics (TP) from Ipomoea batatas leaves and its antioxidant activity. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 12(3), 282–287.

Wiczowski, W., Romaszko, J., Bucinski, A., Szawara-Nowak, D., Honke, J., Zielinski, H. & Piskula, M. K. (2008). Quercetin from shallots (*allium cepa l. var. aggregatum*) is more bioavailable than its glucosides. *J Nutr*, 138(5), 885-888.

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

Table 1 - Total phenolic, flavonoid and anthocyanin content of dry onion skin obtained by microwave focused with different solvent concentrations and temperatures.

Solvent, %	Temperature, °C				Mean	P-value		
	30	50	60	70		S	T	S×T
Total phenolics, mg GAE/g dry onion skin						<0.0001	0.0004	<0.0001
20	345.8	462.3	148.2 ^B	470.6 ^B	356.8	Tendency		
40	491.8	387.9	403.0 ^B	229.5 ^B	378.1	L	Q	
60	283.0 ^b	638.1 ^a	820.1 ^{aA}	815.6 ^{aA}	639.2	S	<0.0001	0.9375
80	373.4 ^b	708.9 ^{ab}	741.4 ^{Aa}	839.3 ^{aA}	665.8	T	<0.0001	0.2199
Mean	373.5	549.3	528.2	588.8				
Total flavonoids, mg QE/g dry onion skin						<0.0001	0.0073	0.4794
20	25.2	24.6	26.1	27.1	25.8 ^B	Tendency		
40	27.1	29.2	27.4	28.7	28.1 ^B	L	Q	
60	33.2	36.2	40.6	41.7	37.9 ^A	S	<0.0001	0.8080
80	36.3	39.9	43.0	43.8	40.8 ^A	T	0.0007	0.8059
Mean	30.5 ^b	32.5 ^{ab}	34,3 ^a	35.4 ^a				
Total anthocyanins, mg cyanidin 3-O-glucoside /100g dry onion skin						<0.0001	0.3496	0.9631
20	117.4	120.6	124.8	119.6	120.6 ^B	Tendency		
40	143.4	202.2	193.9	162.6	175.5 ^B	L	Q	
60	253.1	284.7	345.7	366.6	312.5 ^A	S	<0.0001	0.8635
80	292.1	357.2	369.8	413.5	358.1 ^A	T	0.0781	0.7733
Mean	201.5	241.2	258.5	265.5				

Means with the same small letter in the row do not differ ($P>0.05$) by Tukey's test.

Means with the same capital letter in the column do not differ ($P>0.05$) by Tukey's test.

GAE = Gallic acid equivalent; QE: Quercetin equivalent; S: solvent; T: temperature; L: linear; Q: quadratic; p -value: probabilistic value; CV (%): coefficient of variation; SEM: standard error of the mean

CV (phenolics) = 46.7; CV (flavonoids) = 22.3; CV (anthocyanins) = 53.4

SEM (phenolics) = 34.3; SEM (flavonoids) = 1.1; SEM (anthocyanins) = 18.6

Table 2 - Antioxidant activity of dry onion skin obtained by microwave focused with different solvent concentrations and temperatures.

Solvent, %	Temperature, °C				Mean	P-value		
	30	50	60	70		S	T	S×T
Ferric reducing activity (FRAP), µmol TEAC/g dry onion skin						<0.0001	0.0739	0.2017
20	18.6	18.6	21.7	18.8	19.4 ^C	Tendency		
40	22.8	27.1	40.1	34.6	31.1 ^C	L		
60	79.8	74.3	78.8	91.5	81.1 ^B	S	<0.0001	Q 0.1980
80	64.1	122.7	129.1	119.0	108.7 ^A	T	0.0137	0.4174
Mean	46.3	60.7	67.4	66.0				
DPPH· radical-scavenging activity, µmol TEAC/g dry onion skin						<0.0001	0.3045	0.0788
20	45.2	40.0	28.7	30.0	36.0 ^B	Tendency		
40	58.2	63.1	42.8	70.1	58.6 ^B	L		
60	77.1	73.5	104.0	106.2	90.2 ^A	S	<0.0001	Q 0.9558
80	82.2	100.4	154.9	110.4	112.0 ^A	T	0.1034	0.9861
Mean	65.7	69.2	82.6	79.2				
IC₅₀ % inhibition of DPPH radical, mg/mL						<0.0001	0.0654	0.0230
20	1.2 ^A	1.4 ^A	1.4 ^A	1.3 ^A	1.3	Tendency		
40	0.9 ^{aAB}	0.7 ^{bB}	1.2 ^{aA}	0.7 ^{bB}	0.9	L		
60	0.7 ^B	0.6 ^B	0.5 ^B	0.3 ^B	0.5	S	<0.0001	Q 0.0010
80	0.5 ^B	0.5 ^B	0.4 ^B	0.4 ^B	0.4	T	0.3197	0.0926
Mean	0.8	0.8	0.9	0.7				
β-Carotene bleaching inhibition activities, % (12.5 mg/mL)						<0.0001	0.0046	0.0454
20	34.8 ^{bbB}	56.5 ^{abB}	83.5 ^a	68.7 ^{ab}	60.9	Tendency		
40	64.9 ^{AB}	65.9 ^{AB}	66.6	61.9	64.9	L		
60	76.0 ^A	70.6 ^{AB}	88.0	87.5	80.5	S	<0.0001	Q 0.9987
80	74.1 ^A	92.7 ^A	85.8	85.6	84.5	T	0.0015	0.2368
Mean	62.5	71.4	81.0	75.9				
ABTS· radical-scavenging activity, µmol TEAC/g dry onion skin						<0.0001	0.0471	0.0070
20	12.6 ^B	19.4	16.4	20.5 ^B	17.2	Tendency		
40	26.3 ^{AB}	26.9	23.6	20.0 ^B	24.2	L		
60	47.9 ^{abA}	26.0 ^b	39.6 ^{ab}	57.5 ^{aA}	42.7	S	<0.0001	Q 0.0005
80	25.0 ^{AB}	25.9	39.8	37.7 ^{AB}	32.2	T	0.0718	0.0348
Mean	28.1	24.6	29.8	33.9				

Means with the same small letter in the row do not differ ($P>0.05$) by Tukey's test. Means with the same capital letter in the column do not differ ($P>0.05$) by Tukey's test. TEAC = trolox equivalent antioxidant capacity; S: solvent; T: temperature; L: linear; Q: quadratic; p -value: probabilistic value; CV (%): coefficient of variation; SEM: standard error of the mean. CV (FRAP) = 71.5; CV (DPPH) = 53.2; CV (IC₅₀) = 50.7; CV (β-carotene) = 24.1; CV (ABTS) = 46.5; SEM (FRAP) = 6.2; SEM (DPPH) = 5.7; SEM (IC₅₀) = 0.1; SEM (β-carotene) = 2.5; SEM (ABTS) = 2.0

Table 3- Antimicrobial activity of red onion skin extracts obtained by microwave focused with different solvent concentrations and temperatures.

Gram-negative bacteria	ATCC/Source	Extract
<i>Escherichia coli</i>	25922	*nd
<i>Shigella flexneri</i>	12022	nd
<i>Enterobacter aerogenes</i>	13048	nd
<i>Acinetobacter baumannii</i>	19606	nd
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PA01	nd
<i>Salmonella choleraesuis</i>	10708	nd
<i>Salmonella enteritidis</i>	Clinical isolate	nd
Gram-positive bacteria		
<i>Listeria monocytogenes</i>	7644	nd
<i>Bacillus cereus</i>	9634	nd
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	35985	nd
<i>Enterococcus faecium</i>	6569	nd
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	nd
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212	nd
<i>Streptococcus sp</i>	Clinical isolate	nd
Fungi		
<i>Candida kefyr</i>	ATCC 66028	nd
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Environmental isolate	nd

*nd: detected not

MANUSCRITO 3

**EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM DE COMPOSTOS
FENÓLICOS E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DA
CASCA DE CEBOLA ROXA (*Allium cepa* L.)**

**Artigo em fase de revisão pelos autores para submissão à revista Food
Chemistry**

(Formatado conforme as normas da revista)

ORIGINAL ARTICLE

Extração assistida por ultrassom de compostos fenólicos e avaliação da capacidade antioxidante da casca de cebola roxa (*Allium cepa* L.)

Vanessa Bordin Viera^{*a}; Natiéli Piovesan^a; Renius de Oliveira Mello^a; Juliano Smanioto Barin^a;
Aline de Oliveira Fogaça^b; Cesar Augusto Bizzi^c; Érico Marlon de Moraes Flores^c; Ernesto
Hashime Kubota^a

^aDepartamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, Santa Maria/RS/Brasil,

^bCurso de Farmácia, Centro Universitário Franciscano – UNIFRA, Santa Maria/RS/Brasil.

^cDepartamento de Química, Centro de Ciências Naturais, Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, Santa Maria/RS/Brasil. E-mails: vanessa.bordinviera@gmail.com; natipiovesan@bol.com.br; reniusmello@gmail.com; juliano@ufsm.br; alinefogaca@gmail.com; c_bizzi@yahoo.com.br; ericommf@gmail.com; ernestokubota@smail.ufsm.br

*Corresponding author: Av. Roraima n° 1000, Prédio 42, Cidade Universitária, Bairro Camobi, CEP 97105-900, Santa Maria, RS – Brasil, Fone: +55 55 3220 8254, e-mail: vanessa.bordinviera@gmail.com

Resumo

Este estudo teve como objetivo determinar o teor de compostos fenólicos, flavonóides e antocianinas totais, bem como a atividade antioxidante do extrato de casca de cebola roxa (*Allium cepa* L.) obtido por extração em ultrassom em diferentes potências (130 e 750 W), pulsos (pulsado e contínuo) e concentrações de solvente (20, 40, 60 e 80%). A atividade antioxidante dos extratos foi avaliada usando o método do sequestro do radical DPPH, inibição da auto-oxidação do sistema β -caroteno, métodos ABTS, FRAP e cálculo do IC₅₀. Os resultados indicaram que a potência do ultrassom 130 W, modo pulsado de extração e solvente 60% favoreceu a extração de flavonoides totais, antocianinas totais, atividade antioxidante pelos métodos FRAP e β -caroteno. Os maiores teores de fenólicos totais foram encontrados com solvente 60%, potência 130 W e modo contínuo de extração. A atividade antioxidante pelo método DPPH foi influenciada somente pelo solvente 60% e a atividade antioxidante pelo método ABTS foram maiores com solvente 80%, modo pulsado e 130 W. Para menor atividade antioxidante IC₅₀ as condições necessárias são 130 W, modo pulsado e 40% de solvente. Pode-se afirmar que a casca de cebola roxa é boa fonte de compostos bioativos com ação antioxidante, podendo ser utilizada como ingrediente funcional na elaboração de produtos alimentícios e assim contribuir também na redução de resíduos agro-industriais.

Keywords: cebola roxa, antocianinas, atividade antioxidante.

1. Introdução

A cebola (*Allium cepa* L.) é um vegetal da família *Allium* apreciada em todo o mundo não apenas pelo seu sabor, mas também como uma fonte significativa de muitos compostos benéficos. Estudos revelaram a presença de vários flavonóides em diferentes variedades de

cebolas, juntamente com outros compostos bioativos (Lachman, Pronek, Hejtmánková, Dudjak, Pivic & Faitová, 2003), sendo quase todos estes localizados principalmente nas cascas. Wiczowski et al. (2008) encontraram maior concentração de quercitina na casca da cebola quando comparada com a parte carnosa. Além disso, Nuutila, Kammiovirta & Oksman-Caldentey (2002) evidenciaram que extratos da casca de cebola possuem alta capacidade antioxidante.

Diversas técnicas de extração de compostos bioativos têm sido estudadas e utilizadas atualmente buscando melhorar a eficiência, qualidade do extrato, diminuir tempo e consumo de solvente. A extração assistida por ultrassom é considerada como um processo de extração verde (Chemat, Zill-e-Huma & Khan, 2011; Rombaut, Tixier, Bily & Chemat, 2014). Sua eficiência tem sido comprovada durante a extração de compostos bioativos, proporcionando rendimentos mais elevados em comparação com extrações clássicas, preservando também as atividades dos extratos (Lianfu & Zelong, 2008; Pingret, Fabiano-Tixier, Bourvellec, Renard & Chemat, 2012). Também tem sido largamente aplicada para a extração de antioxidantes, devido à sua elevada eficiência, em termos de rendimento, de recuperação e taxa de extração (Jacotet-Navarro, Romabaut, Fabiano-Tixier, Danguien, Bily & Chemat, 2015; Chen, Zhao & Yu, 2015).

Estudos com diversas matérias-primas como casca de coco (Rodrigues, Pinto & Fernandes, 2008), sementes de urucum (Yolmeh, Najafi, & Farhoosh, 2014), borras de vinho (Tao, Wu, Zhang, & Sun, 2014) e romã (Tabaraki, Heidarizadi & Benvidi, 2012) têm sido realizados utilizando o ultrassom para obtenção de compostos bioativos. No entanto, não foi encontrada informação da aplicação do ultrassom na extração de compostos bioativos da casca da cebola roxa.

Diante do exposto, este estudo teve como objetivo determinar o teor de compostos fenólicos, flavonóides e antocianinas totais, bem como a atividade antioxidante do extrato de

casca de cebola roxa (*Allium cepa L.*) obtido por extração assistida por ultrassom em diferentes potências, pulsos e concentrações de solvente.

2 Materiais e Métodos

2.1 Matéria-prima

Cebolas roxas (*Allium Cepa L.*) foram adquiridas em estabelecimento comercial, localizado na cidade de Santa Maria, Rio Grande do Sul. As cebolas foram selecionadas pela ausência de defeitos, pragas e doenças, tiveram suas superfícies lavadas com detergente neutro para remover a sujeira, e enxaguadas em água corrente. Foi realizada a sanitização com 200 mg.L⁻¹ de hipoclorito de sódio durante 20 min, enxágue e em seguida foram descascadas manualmente com facas de aço inoxidável. As cascas foram colocadas em bandejas e levadas para estufa de circulação de ar forçada (Marconi, MA-035/100, Piracicaba, Brasil) à 50 °C por 24 horas. Após foram trituradas em moinho analítico refrigerado à 4 °C (Quimis, modelo Q298A21, Brasil) com o auxílio de um banho de ultra-termostatizado (Solab, modelo SL-152/10) e armazenadas em frasco âmbar à temperatura de -18°C, até a obtenção do extrato.

2.2 Extração assistida por ultrassom (EAU)

Para o procedimento de extração foi utilizado gerador de ultrassom Sonic Vibra-Cell (Sonics and Materials, Newton, USA), com sonda de 3 e 13 mm de diâmetro e 245 mm de comprimento (Sonics and Materials Inc., USA) operando em frequência constante de 20 KHz e amplitude de 40%. A amostra previamente moída foi pesada e transferida para um reator de aço inoxidável arrefecido a água e adicionada o solvente álcool de cereais na proporção 1:20 (m/v). Em seguida a amostra foi sonicada utilizando diferentes parâmetros: concentração de solvente (álcool de cereais: 20, 40, 60 e 80% v/v), potência (130 e 750 W), modo contínuo e pulsado

durante o tempo de 20 minutos à temperatura de 25 ± 2 °C. No modo pulsado foram aplicados ciclos (pulsos) de 30 s de funcionamento (30 s ligado/ 30 s desligado) e no modo contínuo o ultrassom permaneceu 20 minutos ligado. Após o termino da extração, os extratos foram filtrados em papel filtro qualitativos, centrifugados a 3000 rpm por 15 min, rotaevaporados e completados os volumes ajustados para 50mL. Os sobrenadantes foram transferidos para frascos âmbar e armazenados em freezer (-18 °C) até o momento das análises. Todas as extrações foram realizadas em triplicatas.

2.3 Determinação de Compostos Fenólicos Totais

Para a determinação do teor de fenólicos totais foi utilizado o método de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton, Orthofer & Lamuela-Raventos (1999) com modificações por Roesler (2007). Para a reação colorimétrica, alíquotas de 0,4 mL dos extratos previamente diluídos foram transferidas para tubos de ensaio e adicionadas de 2,0 mL de solução aquosa do reativo de Folin-Ciocalteu 0,2 N (diluído na proporção 1:10). Os tubos foram agitados e deixados em repouso na ausência de luz por 6 minutos. Após, adicionou-se 1,6 mL de carbonato de sódio (Na_2CO_3) 7,5% (m/v) e os tubos foram agitados e incubados durante 5 minutos em banho-maria a 50°C. Em seguida, resfriados em água para leitura em espectrofotômetro (SP – 220 marca Biospectro) a 760 nm, calibrado com uma curva padrão de ácido gálico ($y=0,0012x-0,0025$; $R^2= 0,99$). Os resultados do teor de compostos fenólicos totais foram expressos em miligramas equivalentes de ácido gálico/ g de casca de cebola (mg EAG g^{-1}).

2.4 Determinação de Flavonóides Totais

O teor de flavonoides totais foi determinado de acordo com o método proposto por Zhishen, Mengcheng & Janming (1999). Alíquota de 0,5mL dos extratos previamente diluídos

foram colocados em tubos de ensaio e adicionados de 2 mL de água destilada. Em seguida adicionado 0,15 mL de nitrito de sódio (NaNO₂) e após 5 minutos, 0,15 mL de cloreto de alumínio (AlCl₃). Os tubos foram deixados em repouso por 6 minutos no escuro e após adicionado de 2 mL de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1M e 1,2 mL de água destilada. A solução foi agitada e a absorbância lida em espectrofotômetro (SP – 220 marca Biospectro) a 510 nm, calibrado com curva referência de quercetina ($y = 0,0027x - 0,0772$; $R^2 = 0,96$). Foi preparado um branco nas mesmas condições, porém com substituição do extrato. O teor de flavonoides totais foi expresso em mg equivalente de quercetina/ g de casca de cebola (mg EQ g⁻¹).

2.5 Determinação de Antocianinas Totais

O teor de antocianinas foi determinado pelo método de pH-diferencial (Giusti & Wrolstad, 2001). Alíquota de 0,5 mL do extrato foi diluído com 2,5 mL de tampão de cloreto de potássio 0,025 M, pH 1,0 e tampão de acetato de sódio 0,4 M, pH 4,5, separadamente. As soluções diluídas foram deixadas à temperatura ambiente, na ausência da luz durante 15 minutos e a absorção de cada diluição lida a 520 e 700 nm contra um branco com água destilada. O teor de antocianinas foi calculado usando a seguinte equação 1:

$$CA = A * PM * FD / (\epsilon * P) \quad \text{Equação (1)}$$

Onde: A = CA: Conteúdo de antocianinas (mg/100g de matéria seca); absorbância ($A_{520nm} - A_{700nm}$)_{pH1.0} - ($A_{520nm} - A_{700nm}$)_{pH4.5}, PM= peso molecular da cianidina-3-glicosídeo (C₁₅H₁₁O₆, 449.2), FD = fator de diluição, ϵ =absortividade molar (26900), e P= peso da amostra (g).

2.6 Atividade Antioxidante – Método FRAP

Para determinação da atividade antioxidante por meio da redução do ferro (FRAP) foi utilizada a metodologia descrita por Benzie & Strain (1996). O reagente FRAP foi preparado

somente no momento da análise, através da mistura de 11 mL de tampão acetato (0,3 M, pH: 3,6), 1,1 mL de solução TPTZ (tripiridiltriazina) (10 mM em HCl 40 mM) e 1,1 mL de solução aquosa de cloreto férrico (20 mM). Uma alíquota de 200 µL do extrato previamente diluído foi adicionada a 1800 µL do reagente FRAP e incubado a 37°C em banho-maria por 30 minutos. Para cada amostra foi realizado um branco, sem adição do extrato. As absorbâncias foram medidas após o tempo de incubação em espectrofotômetro (SP- 220 marca Biospectro) no comprimento de onda de 593nm. Como referência, foi utilizado o Trolox e os resultados expressos em µmol equivalentes de trolox / g de amostra (µmol TEAC g⁻¹).

2.7 Atividade Antioxidante – Método DPPH

A metodologia utilizada foi descrita por Brand-Williams, Cuvelier & Berset (1995). Esta fundamenta-se na capacidade de sequestro do radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH). A técnica consistiu na incubação por 30 minutos em ausência da luz de 2,5 mL de uma solução metanólica de DPPH 0,1 mM com 0,5 mL de soluções contendo concentrações crescentes dos extratos da casca de cebola roxa (0,3; 0,6; 1,25; 2,5; 5,0; 10; 15; 20; 25; 30; 35 e 40 mg/mL). Foi realizada uma solução “controle” com 2,5mL da solução metanólica de DPPH em 0,5mL de metanol, substituindo o extrato. A solução “branco” foi o metanol, utilizada para zerar o espectrofotômetro. Após incubação foram realizadas as leituras das amostras em espectrofotômetro (SP- 220 marca Biospectro) no comprimento de onda de 517nm. A capacidade de sequestrar radical livre foi expressa como percentual de inibição de oxidação do radical, calculado conforme a equação 2:

$$\% \text{ Inibição} = ((\text{Abs. DPPH} - \text{Abs. Am/Trolox}) / \text{Abs. DPPH}) * 100 \quad \text{Equação (2)}$$

Onde, Abs. DPPH é a absorvância da solução de DPPH e Abs. Am/Trolox é a absorvância da amostra ou padrão em solução. A Abs. Am/Trolox foi calculada com base na diferença da absorvância da solução de amostra em teste com o seu branco.

O valor de IC₅₀ foi determinado através da equação da reta plotada através dos resultados contendo os valores de concentração (mg/mL) utilizadas no eixo X e os percentuais de proteção encontrados no eixo Y. Também foi construída uma curva padrão de Trolox em μmol versus % de inibição, onde o resultado foi expresso em μmol equivalentes de Trolox/ g de amostra ($\mu\text{mol TEAC g}^{-1}$).

2.8 Atividade Antioxidante – Método ABTS

A atividade antioxidante pelo método ABTS^{•+} (radical 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) foi realizada conforme metodologia descrita por Re, Pellegrini, Proteggente, Pannala, Yang & Rice-Evans (1999) com modificações. O radical ABTS^{•+} foi formado pela reação da solução ABTS 7 mM com a solução de persulfato de potássio 140 mM, incubados a temperatura de 25°C, no escuro durante 16 horas. Uma vez formado o radical, foi diluído em água destilada até obter o valor de absorvância de $0,700 \pm 0,020$ a 734nm. A partir de cada extrato, foram preparadas quatro diluições diferentes, em triplicatas. Em ambiente escuro foi transferido uma alíquota de 15 μL do extrato previamente diluído para tubos de ensaio contendo 1,5 μL do radical ABTS^{•+}. A leitura foi realizada após 6 minutos da reação a 734nm em espectrofotômetro (SP- 220 marca Biospectro). Uma solução controle foi preparada conforme o procedimento descrito acima, sem adição da amostra. Como referência, foi utilizado o Trolox e os resultados expressos em μmol equivalentes de trolox/ g de amostra ($\mu\text{mol TEAC g}^{-1}$).

2.9 Atividade Antioxidante – Método β -caroteno/ácido linoleico

O ensaio foi realizado conforme descrito por Cao et al. (2009) com algumas modificações. Em um balão de fundo redondo protegido da luz foi adicionado 50 mg de ácido linoleico, 200 mg de Tween 40 e 1 mL de solução beta caroteno. Após retirar o clorofórmio em evaporador rotatório a 40°C, por aproximadamente 10 minutos, o resíduo foi dissolvido com a adição de 50 mL de água deionizada e oxigenada, aos poucos e sob vigorosa agitação, para formação de uma emulsão límpida.

Uma alíquota de 5,0 mL da emulsão foi adicionada a um tubo de ensaio contendo 0,5 mL dos extratos diluídos em diferentes concentrações e a absorbância medida imediatamente em espectrofotômetro (SP- 220 marca Biospectro) no comprimento de onda de 470nm. Após a primeira leitura os tubos foram incubados em banho-maria a 50°C para que ocorra a reação de oxidação e em intervalos de 15 minutos até completar 120 minutos foram repetidas as leituras. Foi preparado um controle positivo, contendo 5 mL da emulsão de betacaroteno e 0,5 mL de água destilada e um controle negativo contendo 5 mL da emulsão sem o betacaroteno e 0,5 mL de água destilada.

Os resultados foram expressos em percentagem da atividade antioxidantes conforme Equação 3:

$$\% \text{ Inibição} = [1 - (\text{Abs}_{\text{inicial}} - \text{Abs}_{\text{final}}) / (\text{Abs}_{\text{am}_{\text{inicial}}} - \text{Abs}_{\text{am}_{\text{final}}})] * 100 \quad \text{Equação (3)}$$

onde, % Inibição = percentagem da atividade antioxidante; $\text{Abs}_{\text{inicial}}$ = absorbância inicial do controle; $\text{Abs}_{\text{final}}$ = absorbância final do controle; $\text{Abs}_{\text{am}_{\text{inicial}}}$ = absorbância inicial da amostra e $\text{Abs}_{\text{am}_{\text{final}}}$ = absorbância final da amostra.

2.10 Análise Estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), suas médias ajustadas pelo método dos quadrados mínimos ordinários e comparadas pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5% ($p < 0.05$). Independente da significância das interações foram testadas as tendências via contrastes a partir dos coeficientes para interpolação dos polinômios ortogonais. Adicionalmente, foi realizada estatística descritiva e análise de correlação linear simples de Pearson entre as variáveis estudadas. As análises estatísticas foram realizadas no aplicativo SAS® - *Statistical Analysis System* versão 9.0 (SAS Institute Inc., Cary - NC, USA) (Khattree e Naik, 2000).

3. Resultados e Discussão

3.1 Compostos fenólicos, flavonoides e antocianinas totais

Os resultados na Tabela 1 demonstram os valores p sobre as condições de extração na obtenção de compostos fenólicos totais, flavonoides totais e antocianinas totais.

A interação ($P < 0,05$) entre concentração de solvente, potência e modo de extração (Tabela 1) demonstrou ter influência positiva na extração de maior teor de fenólicos totais da casca de cebola roxa. A contribuição do solvente com concentração mais elevada para uma melhor extração, pode ser atribuída segundo Garcia-Castello, Rodriguez-Lopez, Mayor, Ballesteros, Conedi & Cassano (2015) ao etanol que reduz a constante dielétrica do solvente, aumentando a solubilidade e a difusão de compostos fenólicos. Aliado ao solvente tem-se o modo contínuo de extração que propicia tempo maior e contínuo de sonicação, conseqüentemente prolongando o fenômeno de cavitação, que segundo Vinatoru (2001), provoca um inchamento das células, maior absorção de solvente e alargamento dos poros das paredes das células, permitindo maior

difusividade dos compostos bioativos. Também, a sonicação pode incitar o colapso das paredes celulares e facilitar a lavagem para fora do conteúdo da célula. Com relação a potência, quanto menor a energia (potência) utilizada, pode-se prevenir o aumento da temperatura que pode ser responsável por causar a degradação dos compostos bioativos.

A Tabela 2 apresenta os valores médios do teor de compostos fenólicos totais para os extratos de casca de cebola roxa obtidos através do ultrassom em diferentes condições de concentração de solvente, modo de extração e potência.

Os resultados demonstraram que os valores de fenólicos totais foram superiores com o aumento da concentração de solvente (60-80%) no modo contínuo, potência 130 e 750 W e no modo pulsado, potência 750 W. Corroborando com este estudo, Xu, Zhou, Zheng, Li, Li & Li (2016) verificaram que a extração em ultrassom de compostos fenólicos de flores (*Jatropha integerrima*) foi maior utilizando etanol 50-75%. Rabelo, Machado, Martínez & Hubingi (2016) também encontraram maiores teores de fenólicos totais a partir de resíduos de alcachofra utilizando ultrassom e etanol na concentração de 50 e 75%.

Quanto ao modo de extração, verificou-se que os valores de fenólicos totais foram superiores no modo contínuo quando a extração foi realizada na potência 130 W com solventes 60 e 80% e na potência 750 W com solvente 80%. Em ambas as potências e nas demais concentrações de solvente os valores de fenólicos totais não apresentaram diferença ($P>0,05$) entre os modos contínuo e pulsado. Confirmando os resultados, estudos realizados por Pan et al. (2012) demonstraram que ao utilizarem o ultrassom para extração de compostos antioxidantes da casca de romã obtiveram maior teor de fenólicos totais utilizando modo contínuo de extração.

Em relação à potência do ultrassom (130 e 750 W), pode-se perceber que o teor de fenólicos totais não diferiu ($P>0,05$) nos solventes 60 e 80% em ambos os modos (pulsado e contínuo), não exercendo influência na extração destes compostos. Entretanto, com solvente 20%

em ambos os modos e solvente 40% no modo pulsado, a potência 130 W resultou em valores de fenólicos totais superiores quando comparada com 750 W. Diante dos resultados encontrados para fenólicos totais e buscando alta taxa de extração com baixo consumo de energia e solvente, indica-se a utilização do ultrassom no modo contínuo, potência 130 W e solvente 60%.

Os teores de flavonoides totais foram influenciados positivamente pela concentração de solvente e potência do ultrassom (Tabela 1). As extrações realizadas com menores concentrações de etanol foram menos eficientes para flavonoides totais. Os valores de flavonoides totais aumentaram ($P < 0,05$) à medida que se elevou a concentração do solvente. No entanto, nos solventes 60 e 80% não apresentaram diferença significativa entre si (35,36 e 36,76 mg QE/ g casca de cebola seca respectivamente).

Os compostos fenólicos solúveis estão distribuídos principalmente nos vacúolos das células, enquanto a maioria dos flavonóides e fenólicos insolúveis estão combinados através de ligações covalentes com proteínas e polissacarídeos na parede celular. Segundo Yang, Jiang, Li, Chen, Wang & Zhu (2009) o solvente com maior concentração de etanol pode provocar a desnaturação da proteína, impedindo a dissolução dos compostos bioativos e, em seguida, influenciando a extração, explicando o resultado encontrado neste estudo. Corroborando com este estudo, Tomsik, Pavlic, Vladic, Ramic, Brindza & Vidóvic (2016) ao utilizar o ultrassom na extração de compostos bioativos do alho (*Allium ursinum* L.) e variar concentração de etanol (30, 50 e 70%) observaram que os valores de flavonóides totais sofreram aumento a partir da concentração de etanol (50%). Também segundo Azmir et al. (2013) o aumento da taxa de extração de flavonóides com o aumento da concentração de etanol na mistura etanol/água pode ser devido ao solvente que fornece a polaridade mais adequada para a extração de flavonóides.

Quanto à potência 130 e 750 W do ultrassom, o valor de probabilístico (Tabela 1) apontou influência na extração de flavonóides totais. No entanto, os valores encontrados de 31,36 e 29,47

mg QE/g casca de cebola seca, respectivamente, não apresentaram diferença ($P>0,05$) entre si. Conforme resultados encontrados sugere-se a utilização do ultrassom no modo pulsado, 130 W e solvente 60%, demonstrando que pode-se utilizar condições brandas de energia para obter extrato com maior teor de flavonoides totais.

Através dos resultados (Tabela 1), pode-se observar interação ($P<0,05$) entre solvente, potência e modo de extração para antocianinas totais. Os valores médios dos teores de antocianinas totais para os extratos de casca de cebola roxa obtidos pelo ultrassom variaram de 82,99 a 431,08 mg cianidina 3-O-glicosídeo/100g casca de cebola roxa seca e podem ser visualizados na Tabela 3.

Os valores de antocianinas totais foram maiores com o aumento da concentração de solvente (60-80%) sem diferir ($P>0,05$) entre si, no modo contínuo, 130 W e no modo pulsado, 130 e 750 W. No entanto, no modo contínuo, potência 750 W e solvente 60% apresentou valores superiores de antocianinas, quando comparado com 80%. Em relação ao modo de extração, verificou-se que os valores de antocianinas totais não diferiram ($P>0,05$) entre o modo pulsado e contínuo, sendo o mesmo comportamento verificado para as potências estudadas.

Considerando que as antocianinas são um subgrupo dos flavonoides, verificou-se forte correlação entre antocianinas e flavonóides totais ($r=0,80$; $p<0,001$), demonstrando que as condições que favorecem o máximo de extração de antocianinas totais, são as mesmas dos extratos com maior teor de flavonoides totais, conforme resultado deste estudo. Portanto, baseado nos resultados encontrados e visando economia de energia e solvente para obtenção de extrato com maior teor de antocianinas totais pode-se utilizar ultrassom no modo pulsado, potência 130 W e solvente 60%.

3.2 Atividade antioxidante – FRAP, DPPH, β -caroteno e ABTS

Os resultados na Tabela 4 demonstram os valores p sobre as condições de extração na obtenção da atividade antioxidante pelos métodos DPPH, ABTS, FRAP e β -caroteno dos extratos de casca de cebola roxa. Através dos resultados (Tabela 4), pode-se observar interação ($P < 0,05$) entre solvente, potência e modo de extração para atividade antioxidante ABTS e IC_{50} .

Com relação a atividade antioxidante pelo sequestro do radical ABTS, pode ser visualizado na Tabela 5 que os valores variaram de 9,43 a 78,57 $\mu\text{mol TEAC/g}$ de casca de cebola. Através da interação ($P < 0,05$) entre potência e concentração de solvente no modo contínuo de extração, verificou-se que a atividade antioxidante pelo método ABTS aumentou com a elevação da concentração de solvente não apresentando diferença ($P > 0,05$) entre solvente 60 e 80% nas potências 130 e 750 W. No modo pulsado, observou-se o mesmo comportamento para a potência 750 W. Porém, na potência 130 W o extrato com maior atividade antioxidante pelo método ABTS foi encontrado com solvente 80%.

A interação ($P < 0,05$) na potência 130 W entre concentração de solvente e pulsos apresentou valores superiores no modo pulsado e solvente 80%. No entanto, em 750 W a maior atividade antioxidante pelo método ABTS foi encontrada no modo contínuo e solvente 60%. As demais concentrações de solvente estudadas em ambas as potências, não apresentaram valores com diferença significativa entre o modo de extração pulsado e contínuo.

Conforme os resultados apresentados, a melhor condição para extração de compostos com atividade antioxidante pelo método ABTS pode ser verificada utilizando ultrassom a 130 W, modo pulsado e solvente 80%.

Os valores de IC_{50} variaram de 0,47 a 2,58 mg/mL de casca de cebola seca (Tabela 6). Resultados considerados satisfatórios, pois segundo Arbos, Freitas, Stertz & Dornas (2010) quanto menor o valor de IC_{50} , mais elevada a atividade antioxidante, de modo que valores

superiores a 25 mg / mL são considerados com baixo potencial antioxidante. No modo contínuo de extração, através da interação ($P < 0,05$) (Tabela 4) entre potência e concentração de solvente verificou-se que os extratos com menores IC_{50} (capacidade de inibir 50% do radical livre DPPH) não diferiram ($P > 0,05$) nas concentrações 40, 60 e 80% nas potências de 130 e 750 W. No modo pulsado, verificou-se o mesmo comportamento na potência 130 W. No entanto, na potência 750 W os menores valores para capacidade de inibição dos extratos foram encontrados sem diferir ($P > 0,05$), nos solvente 60 e 80%. Os extratos obtidos com 40, 60 e 80% em ambos os modos não diferiram entre si para IC_{50} quando comparado as potências 130 e 750 W, inferindo que as potências estudadas não influenciaram na concentração inibitória dos extratos obtidos nas respectivas concentrações de solvente.

A interação ($P < 0,05$) (Tabela 4) entre concentração de solvente e pulsos em ambas as potências (130 e 750 W) demonstraram valores de IC_{50} que não apresentaram diferença ($P > 0,05$) entre si quando comparado o modo contínuo e pulsado de extração. Assim, diante das condições estudadas, verificou-se que para obtenção de um extrato com elevada capacidade para inibir 50% do radical livre DPPH deve-se utilizar o ultrassom no modo pulsado, potência 130 W e solvente 40%.

Para atividade antioxidante FRAP houve interação ($P < 0,05$) (Tabela 4) entre solvente e potência e entre solvente e modo de extração. Conforme Tabela 7, os valores da atividade antioxidante pelo método FRAP variaram de 15,27 a 114,54 $\mu\text{mol TEAC/g}$ de casca de cebola seca. A atividade antioxidante pelo método FRAP foi maior com os solvente 60 e 80% sem diferir ($P > 0,05$) entre si em ambas as potências. O solvente 80% apresentou atividade antioxidante superior na potência 750 W quando comparado com 130 W. No entanto, os valores de atividade antioxidante nas demais concentrações de solvente não diferiram entre as potências estudadas.

A extração realizada no modo contínuo apresentou valores pelo método FRAP superiores com o aumento da concentração de solvente, sendo que entre 40, 60 e 80% os valores não diferiram ($P>0,05$) entre si. Entretanto, os extratos obtidos pelo modo pulsado apresentaram valores superiores com solvente 60%. A diferença ($P<0,05$) entre o modo contínuo e pulsado foi encontrada somente com solvente 60%, sendo a maior atividade antioxidante no modo pulsado. Para obtenção de extratos com maior potencial antioxidante pelo método FRAP, redução de energia e menor consumo de solvente, indica-se a utilização do ultrassom no modo pulsado, potência 130 W e solvente 60%.

Já para β -caroteno a interação ($P<0,05$) (Tabela 4) ocorreu somente entre potência e modo de extração. A Tabela 8 demonstra os valores médios da capacidade de inibir a oxidação do ácido linolêico dos extratos de casca de cebola roxa a uma concentração de 12,5 mg/mL, apresentando valores de 65,18 a 75,25%.

Através da interação ($P<0,05$) entre potência e modo de extração verificou-se (Tabela 8) que os extratos obtidos nas potências 130 e 750 W apresentaram valores de betacaroteno que não diferiram ($P>0,05$) entre si quando comparado modo contínuo e pulsado de extração. O mesmo comportamento foi observado em relação às potências estudadas, que apresentaram valores de betacaroteno sem diferença ($P>0,05$) entre si em ambos os modos de extração (contínuo e pulsado). Como os valores ficaram muito próximos, estatisticamente não diferiram ($P>0,05$) entre si. Sendo assim, recomenda-se a utilização do ultrassom com baixa energia (130 W) e modo pulsado de extração para obtenção de extrato com maior poder de inibição da oxidação de ácido linolêico (70,76%), independente da concentração do solvente, pois as diferentes concentrações não influenciaram na extração.

No entanto, não houve interação ($P > 0,05$) (Tabela 4) entre as condições estudadas (solvente, potência e modo) para atividade antioxidante (DPPH). Os valores de p indicam que a atividade antioxidante (DPPH) foi influenciada somente pela concentração de solvente.

Os valores de atividade antioxidante pelo método DPPH sofreram influência somente da concentração de solvente. Verificou-se que os extratos obtidos com solventes 20, 40, 60 e 80% apresentaram atividade antioxidante de 26,12, 44,47, 83,27 e 59,65 $\mu\text{mol TEAC/g}$ de casca de cebola seca respectivamente. No entanto, o solvente 60% apresentou diferença estatística ($P < 0,05$) resultando no extrato com maior atividade antioxidante. Este resultado é semelhante ao encontrado por Pradal, Vauchel, Decossin & Dhuster (2016) que ao utilizar o ultrassom e diferentes concentrações de etanol (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100%) para extração de compostos bioativos da chicória observaram maior atividade antioxidante pelo método DPPH quando a concentração de etanol foi de 50-60%, sendo que a partir de 60% a atividade antioxidante reduziu.

Portanto, diante das diferentes metodologias testadas das atividades antioxidantes (FRAP, DPPH, ABTS e β -caroteno) verificou-se que os maiores valores foram encontrados com o ultrassom operando em modo pulsado e menor potência (130 W), resultando em extratos com maior capacidade antioxidante. Segundo Tomsik, Pavlic, Vladic, Ramic, Brindza & Vidóvic (2016) maior potência do ultrassom pode induzir a maiores danos nas paredes celulares, causando a liberação de mais antioxidantes, incluindo compostos fenólicos. Mas ao mesmo tempo a maior potência de ultrassom pode levar à degradação de certos constituintes sensíveis presentes no alho (*Allium ursinum* L.), confirmando os resultados encontrados neste estudo.

Em relação ao modo contínuo e pulsado do ultrassom, o modo contínuo de trabalho pode causar aquecimento durante a extração. No entanto, operando de modo pulsado, o tempo entre os impulsos atua como tempo de repouso no quais pequenas bolhas e cavidades instáveis são

geradas pelo colapso das bolhas. O colapso da bolha gera calor e pressão que pode degradar sensíveis compostos sendo, portanto, o ultrassom pulsado mais eficiente que a sonicação contínua, resultado encontrado neste estudo. Também segundo Saleh, Vinatoru, Mason, Abdel-Azim, Aboutabl & Hammouda (2016) a sonicação prolongada, no caso deste estudo a contínua, também pode induzir muita cavitação, causar moagem excessiva do material da planta bem como degradação dos compostos bioativos.

Considerando a casca de cebola roxa onde os compostos bioativos solúveis geralmente encontram-se localizados em compartimentos dentro dos vacúolos celulares, na forma livre ou conjugada e os insolúveis ligados a estruturas de parede celular. O ultrassom facilita a extração destes compostos e aumenta a transferência de massa, pois envolve força de cisalhamento criada pela implosão de microbolhas, permitindo uma maior penetração do solvente na matriz, aumentando a área de superfície de contato entre a fase sólida e líquida e liberando grande quantidade de calor (Veillet, Toamo & Chemat, 2010; Chemat, Zill-e-Huma & Khan, 2011).

4. CONCLUSÕES

De um modo geral, os resultados do presente estudo indicaram que a potência do ultrassom 130 W, modo pulsado de extração e solvente 60% favoreceram a extração de flavonoides totais, antocianinas totais, atividade antioxidante pelo método FRAP e β -caroteno. Os maiores teores de fenólicos totais foram encontrados com solvente 60%, potência 130 W e modo contínuo de extração. A atividade antioxidante pelo método DPPH foi influenciada somente pelo solvente 60% e os valores pelo método ABTS foram maiores com solvente 80%, modo pulsado e 130 W. Para maior poder de inibição de 50% do radical DPPH (IC50) as condições necessárias são 130 W, modo pulsado e 40% de solvente. Pode-se afirmar que a casca de cebola roxa é boa fonte de compostos bioativos com ação antioxidante, podendo ser utilizada

como ingrediente funcional na elaboração de produtos e assim contribuir também na redução de resíduos agro-industriais.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/FAPERGS) por fornecer bolsa de doutorado ao primeiro autor e também ao Laboratório de Química Industrial e Ambiental do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria, RS.

5. Referencias Bibliográficas

Arbos, K. A., Freitas, R. J. S. D., Stertz, S. C., & Dornas, M. F. (2010). Atividade antioxidante e teor de fenólicos totais em hortaliças orgânicas e convencionais. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30(2), 501-506.

Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M.; Mohamed, A.; Sahena, F.; Jahurul, M. H. A.; Ghafoor, K.; Norulaini, N. A. N.; and Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426–436.

Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1999). Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology*, 299, 15-27.

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

Cao, L., Si, J. Y., Liu, Y., Sun, H., Jin, W., Li, Z., Zhao, X. H. & Pan, R. L. (2009). Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant properties of *Mosla chinensis* Maxim. *Food Chemistry*, 115(3), 801-805.

- Chemat, F., Zill-e-Huma, & Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(4), 813–835.
- Chen, M., Zhao, Y. & Yu, S. (2015). Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from sugar beet molasses. *Food Chemistry*, 172, 543–550
- Garcia-Castello, E.M., Rodriguez-Lopez, A.D., Mayor, L., Ballesteros, R., Conidi, C., Cassano, A., (2015). Optimization of conventional and ultrasound assisted extraction of flavonoids from grapefruit (*Citrus paradisi* L.) solid wastes. *Food Science Technology*, 64(2), 1114-1122.
- Giusti, M. M. & Wrolstad, R. E. (2001). Anthocyanins. Characterization and Measurement with UV-Visible Spectroscopy. In: Wrolstad, R. E. (Ed.). *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, p. 1-13. New York: John Wiley & Sons.
- Jacotet-Navarro, M., Rombaut, N., Fabiano-Tixier, A. S., Danguien, M., Bily, A., Chemat, F. (2015). Ultrasound versus microwave as green processes for extraction of rosmarinic, carnosic and ursolic acids from Rosemary, *Ultrasonics. Sonochemistry*, 27, 102–109.
- Khattree, R. and Naik, D. N. 2000. Multivariate data reduction and discrimination with SAS software Cary, p. 558. USA: SAS Institute Inc.
- Lachman, J., Pronek, D., Hejtmánková, A., Dudjak, J., Pivec, V. & Faitová, K. (2003). Total polyphenol and main flavonoid antioxidants in different onion (*Allium cepa* L.) varieties. *Horticultural Science*, 30(4), 142-147.
- Lianfu, Z & Zelong, I. (2008). Optimization and comparison of ultrasound/microwave assisted extraction (UMAE) and ultrasonic assisted extraction (UAE) of lycopene from tomatoes, *Ultrasonics. Sonochemistry*, 15, 731–737.

- Nuutila, A. M., Kammiovirta, K. & Oksman-caldentey, K. M. (2002). Comparison of methods for the hydrolysis of flavonoids and phenolic acids from onion and spinach for HPLC analysis. *Food Chemistry*, 76(4), 519-525.
- Pingret, D., Fabiano-Tixier, A. Z., Bourvellec, C. L., Renard, C. M. G. C. & Chemat., F. (2012). Lab and pilot-scale ultrasound-assisted water extraction of polyphenols from apple pomace, *Journal of Food Engineering*, 111(1), 73–81.
- Pradal, D., Vauchel, P., Decossin, S. & Dhulster, P. K. D. (2016). Kinetics of ultrasound-assisted extraction of antioxidant polyphenols from food by products: Extraction and energy consumption optimization, *Ultrasonics Sonochemistry*, 32, 137–146.
- Rabelo, R. S., Machado, M. T. C., Martínez, J. & Hubinge, M. D. (2016). Ultrasound assisted extraction and nanofiltration of phenolic compounds from artichoke solid wastes, *Journal of Food Engineering*, 178, 170-180.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26(9-10), 1231–1237.
- Rodrigues, S., Pinto, G. A. S., & Fernandes, F. A. N. (2008). Optimization of ultrasound extraction of phenolic compounds from coconut (*Cocos nucifera*) shell powder by response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15, 95–100.
- Roesler, R., Malta, L. G., Carrasco, L. C., Holanda, R. B., Sousa, C. A. S. & Pastore, G. M. (2007). Atividade antioxidante de frutas do cerrado. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos*, 27 (1), 53-60.
- Rombaut, N., Tixier, A. S., Bily, A & Chemat, F. (2014). Green extraction processes of natural products as tools for biorefinery. *Biofuels Bioproducts & Biorefining*, 8(4), 530–544.

Saleh, I. A., Vinatoru, M., Mason, J., Abdel-Azim, N. S., Aboutabl, E. A & Hammouda, F. M. (2016). A possible general mechanism for ultrasound-assisted extraction (UAE) suggested from the results of UAE of chlorogenic acid from *Cynara scolymus* L. (artichoke) leaves. *Ultrasonics Sonochemistry*, 31, 330–336.

Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*, 299, 152-178.

Tabaraki, R., Heidarizadi, E., Benvidi, A. (2012). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of pomegranate (*Punica granatum* L.) peel antioxidants by response surface methodology. *Separation and Purification Technology*, 98, 16–23,

Tao, Y., Wu, D., Zhang, Q. A. & Sun, D. W. (2014). Ultrasound-assisted extraction of phenolics from wine lees: Modeling, optimization and stability of extracts during storage. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(2), 706–715.

Tomšik, A., Pavlič, B., Vladić, J., Ramić, J., Brindza, J. & Vidović, S. (2016). Optimization of ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from wild garlic (*Allium ursinum* L.). *Ultrasonics Sonochemistry*, (29), 502–511

Veillet, S., Tomao, V. & Chemat, F. (2010) .Ultrasound assisted maceration: An original procedure for direct aromatization of olive oil with basil. *Food Chemistry*, 123(3), 905–911,

Vinatoru, M. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs, *Ultrasonics Sonochemistry*, 8(3), 303–313

Wiczowski, W., Romaszko, J., Bucinski, A., Szawara-Nowak, D., Honke, J., Zielinski, H. & Piskula, M. K. (2008). Quercetin from shallots (*allium cepa* l. var. *aggregatum*) is more bioavailable than its glucosides. *The Journal of Nutrition*, 138(5), 885-888.

- Xu, D. P., Zhou, Y., Zheng, J., Li, S., Li, A. N. & Li, H. B. (2016). Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Natural Antioxidants from the Flower of *Jatropha integerrima* by Response Surface Methodology. *Molecules*, 21(1), 18.
- Yang, Li., Jiang, Jian-Guo., Li, Wei-Feng., Chen, Jian., Wang, Ding-Yong. & Zhu, Liang. (2009). Optimum extraction Process of polyphenols from the bark of *Phyllanthus emblica* L. based on the response surface methodology, *Journal of Separation Science*, 32(9), 1437–1444.
- Yolmeh M., Najafi M. B. H. & Farhoosh R. (2014). Optimisation of ultrasound-assisted extraction of natural pigment from annatto seeds by response surface methodology (RSM). *Food Chemistry*, 155, 319-324.
- Zhishen, J., Mengcheng, T. & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4), 555-559.

Tabela 1- Resultados ($p = 0,05$) para analisar o efeito de independência ou interações entre fatores de tratamento em compostos fenólicos totais, flavonoides totais e antocianinas totais obtidos por ultrassom com diferentes concentrações de solvente, potências e modo de extração.

	Independentes			Interação			
	Solvente	Potência	Modo	S x P	S x M	PxM	S x P x M
CFT	<,0001	0,0007	<,0001	0,0004	<,0001	0,0441	0,0013
FT	<,0001	0,0058	0,8994	0,9031	0,1020	0,3053	0,5680
AT	<,0001	0,0024	0,4473	0,9090	0,430	0,8048	0,0142

$p > 0,05$: insignificante; $p < 0,05$: significativo; S: solvente; P: potência; M: modo; CFT: Conteúdo de fenólicos totais; FT: Flavonóides totais; AT: Antocianinas totais.

Tabela 2 – *Teor de compostos fenólicos totais na casca de cebola roxa obtidos por ultrassom com diferentes concentrações de solvente, potências e modos de extração.

Potência (W)	Solvente (%)				Média	
	20	40	60	80		
Modo contínuo						
130	405,65 ^{bA}	402,68 ^b	785,27 ^a	822,87 ^a	604,12	
750	117,50 ^{bB}	340,83 ^b	579,35 ^a	749,90 ^a	446,89	
Média	261,57	371,75	682,31	786,38		
Modo pulsado						
130	419,16 ^a	607,68 ^{aA}	270,46 ^b	243,05 ^b	385,09	
750	149,72 ^b	320,46 ^{abB}	477,31 ^a	414,35 ^{ab}	340,46	
Média	284,44	464,07	373,88	328,70		
Modo (pulsos)	Solvente (%)				Média	
	20	40	60	80		
Potência (130 W)						
Contínuo	405,65 ^b	402,68 ^b	785,27 ^{aA}	822,87 ^{aA}	604,12	
Pulsado	419,16 ^{ab}	607,68 ^a	270,46 ^{bB}	243,05 ^{bB}	385,09	
Média	412,40	505,18	527,87	532,96		
Potência (750 W)						
Contínuo	117,50 ^b	340,83 ^b	579,35 ^a	749,90 ^{aA}	446,89	
Pulsado	149,72 ^b	320,46 ^{ab}	477,31 ^a	414,35 ^{abB}	340,46	
Média	133,61	330,64	528,33	582,13		
Potencia (W)	Modo (pulsos)					
	Contínuo	Pulsado	Média	Contínuo	Pulsado	Média
Solvente (20%)						
130	405,65 ^A	419,16 ^A	412,40	402,68	607,68 ^A	505,18
750	117,50 ^B	149,72 ^B	133,61	340,83	320,46 ^B	330,65
Média	261,57	284,44		371,76	464,07	
Solvente (60%)						
130	785,27 ^a	270,46 ^b	527,87	822,87 ^a	243,05 ^b	532,96
750	579,35	477,31	528,33	749,90 ^a	414,35 ^b	582,13
Média	682,31	373,89		786,39	329,70	
Solvente (80%)						
130	785,27 ^a	270,46 ^b	527,87	822,87 ^a	243,05 ^b	532,96
750	579,35	477,31	528,33	749,90 ^a	414,35 ^b	582,13
Média	682,31	373,89		786,39	329,70	

Médias com a mesma letra minúscula na linha não diferem ($P > 0,05$) teste de Tukey's

Médias com a mesma letra maiúscula na coluna não diferem ($P > 0,05$) teste de Tukey's

CV (%): coeficiente de variação; EPM: erro padrão das médias

GAE = ácido gálico equivalente;

CV (fenólicos) = 50,4; EPM (fenólicos) = 32,3; *mg EAG/g casca de cebola seca

Tabela 3 – *Teor de antocianinas totais em casca de cebola roxa obtidos por ultrassom com diferentes concentrações de solvente, potências e modos de extração.

Potência (W)	Solvente (%)				Média	
	20	40	60	80		
Modo contínuo						
130	82,99 ^b	153,63 ^b	313,19 ^a	292,48 ^a	210,57	
750	84,75 ^c	193,20 ^{bc}	431,08 ^a	286,30 ^b	248,83	
Média	83,87	173,42	372,13	289,39		
Modo pulsado						
130	86,42 ^b	168,91 ^b	324,96 ^a	288,14 ^a	217,10	
750	154,80 ^b	190,87 ^b	316,28 ^a	384,58 ^a	261,63	
Média	120,61	179,89	320,62	336,36		
Modo (pulsos)	Solvente (%)				Média	
	20	40	60	80		
Potência (130 W)						
Contínuo	82,99 ^b	153,63 ^b	313,19 ^a	292,48 ^a	210,57	
Pulsado	86,42 ^b	168,91 ^b	324,96 ^a	288,14 ^a	217,10	
Média	84,70	161,27	319,07	290,31		
Potência (750 W)						
Contínuo	84,75 ^c	193,20 ^{bc}	431,08 ^a	286,30 ^b	248,83	
Pulsado	154,80 ^b	190,87 ^b	316,28 ^a	384,58 ^a	261,63	
Média	119,77	192,03	373,67	335,44		
Potencia (W)	Modo (pulsos)					
	Contínuo			Pulsado		
	Contínuo	Pulsado	Média	Contínuo	Pulsado	Média
Solvente (20%)						
130	82,99	86,42	84,70	153,63	168,91	161,27
750	84,75	154,80	119,77	193,20	190,87	192,04
Média	83,87	120,61		173,42	179,89	
Solvente (60%)						
130	313,19	324,96	319,07	292,48	288,14	290,31
750	431,08	316,28	373,67	286,30	384,58	335,44
Média	372,13	320,62		289,39	336,35	
Solvente (80%)						

Médias com a mesma letra minúscula na linha não diferem ($P > 0,05$) teste de Tukey's

Médias com a mesma letra maiúscula na coluna não diferem ($P > 0,05$) teste de Tukey's

CV (%): coeficiente de variação; EPM: erro padrão das médias

CV (antocianinas) = 48,1; EPM (antocianinas) = 16,3; *mg cianidina 3-O-glicosídeo/100g casca de cebola seca.

Tabela 4- Resultados ($p = 0,05$) para analisar o efeito de independência ou interações entre fatores de tratamento em atividades antioxidantes pelos métodos FRAP, DPPH, ABTS e β -caroteno dos extratos de casca de cebola roxa obtidos por ultrassom com diferentes concentrações de solvente, potências e modo de extração.

	Independentes			Interação			
	Solvente	Potência	Modo	S x P	S x M	PxM	S x P x M
FRAP	<,0001	0,0160	0,5027	0,0006	0,0014	0,0963	0,4651
DPPH	<,0001	0,3750	0,4164	0,6112	0,5387	0,1244	0,5966
IC ₅₀	<,0001	0,0009	0,5398	0,0349	0,0780	0,2691	0,0244
ABTS	<,0001	0,2372	0,9172	0,0190	<,0001	<,0001	0,0024
β -caroteno	<,0001	0,7313	0,3136	0,2204	0,1936	0,0484	0,8466

p>0,05: insignificante; p<0.05: significativo; S: solvente; P: potência; M: modo.

Tabela 5- *Valores médios de atividade antioxidante pelo método ABTS em casca de cebola roxa obtidos por ultrassom com diferentes concentrações de solvente, potências e modos de extração.

Potência (W)	Solvente (%)				Média	
	20	40	60	80		
Modo contínuo						
130	9,43 ^b	14,66 ^b	44,36 ^a	27,34 ^{ab}	23,95	
750	17,02 ^b	30,21 ^b	60,48 ^a	44,10 ^a	37,95	
Média	13,23	22,43	52,42	35,72		
Modo pulsado						
130	10,54 ^b	21,07 ^b	30,29 ^b	78,57 ^{aA}	35,12	
750	9,75 ^b	16,93 ^b	36,90 ^a	41,75 ^{aB}	26,33	
Média	10,14	19,0	33,60	60,16		
Modo (pulsos)	Solvente (%)				Média	
	20	40	60	80		
Potência (130 W)						
Contínuo	9,43 ^b	14,66 ^b	44,36 ^a	27,34 ^{abB}	23,95	
Pulsado	10,54 ^b	21,07 ^b	30,29 ^b	78,57 ^{aA}	35,12	
Média	9,99	17,9	37,33	52,95		
Potência (750 W)						
Contínuo	17,02 ^b	30,21 ^b	60,48 ^{aA}	44,10 ^a	37,95	
Pulsado	9,75 ^b	16,93 ^b	36,90 ^{aB}	41,75 ^a	26,33	
Média	13,39	23,57	48,7	42,93		
Potencia (W)	Modo (pulsos)					
	Contínuo			Pulsado		
	Contínuo	Pulsado	Média	Contínuo	Pulsado	Média
Solvente (20%)						
130	9,43	10,54	9,99	14,66	21,07	17,9
750	17,02	9,75	13,39	30,21	16,93	23,57
Média	13,23	10,14		22,43	19,0	
Solvente (60%)						
130	44,36	30,39	37,33	27,34 ^b	78,57 ^{aA}	52,95
750	60,48 ^a	36,90 ^b	48,7	44,10	41,75 ^B	42,93
Média	52,42	33,60		35,72	60,16	
Solvente (80%)						

Médias com a mesma letra minúscula na linha não diferem ($P > 0,05$) teste de Tukey's

Médias com a mesma letra maiúscula na coluna não diferem ($P > 0,05$) teste de Tukey's

CV (%): coeficiente de variação; EPM: erro padrão das médias

CV (ABTS) = 65,2; EPM (ABTS) = 2,9; * $\mu\text{mol TEAC/g}$ casca de cebola roxa

Tabela 6 – *Valores médios da capacidade de inibição 50% do radical livre DPPH (IC₅₀) da casca de cebola roxa obtidos por ultrassom com diferentes concentrações de solvente, potências e modos de extração.

Potência (W)	Solvente (%)				Média	
	20	40	60	80		
Modo contínuo						
130	1,78 ^{aA}	0,85 ^b	0,47 ^b	0,47 ^b	0,89	
750	2,58 ^{aB}	0,91 ^b	0,59 ^b	0,87 ^b	1,24	
Média	2,17	0,88	0,53	0,67		
Modo pulsado						
130	1,81 ^a	0,86 ^b	0,60 ^b	0,79 ^b	1,01	
750	2,12 ^a	1,58 ^a	0,39 ^b	0,72 ^b	1,20	
Média	1,96	1,21	0,49	0,75		
Modo (pulsos)	Solvente (%)				Média	
	20	40	60	80		
Potência (130 W)						
Contínuo	1,78 ^a	0,85 ^b	0,47 ^b	0,47 ^b	0,89	
Pulsado	1,81 ^a	0,86 ^b	0,60 ^b	0,79 ^b	1,01	
Média	1,79	0,85	0,53	0,63		
Potência (750 W)						
Contínuo	2,58 ^a	0,91 ^b	0,59 ^b	0,87 ^b	1,24	
Pulsado	2,12 ^a	1,58 ^a	0,39 ^b	0,72 ^b	1,20	
Média	2,35	1,24	0,49	0,79		
Potencia (W)	Modo (pulsos)			Contínuo	Pulsado	Média
	Contínuo	Pulsado	Média			
Solvente (20%)						
130	1,78 ^A	1,81	1,79	0,85	0,86	0,85
750	2,58 ^B	2,12	2,35	0,91	1,58	1,24
Média	2,18	1,97		0,88	1,22	
Solvente (60%)						
130	0,47	0,60	0,53	0,47	0,79	0,63
750	0,59	0,39	0,49	0,87	0,72	0,79
Média	0,57	0,49		0,67	0,75	
Solvente (80%)						
130	0,47	0,60	0,53	0,47	0,79	0,63
750	0,59	0,39	0,49	0,87	0,72	0,79
Média	0,57	0,49		0,67	0,75	

Médias com a mesma letra minúscula na linha não diferem (P>0,05) teste de Tukey's

Médias com a mesma letra maiúscula na coluna não diferem (P>0,05) teste de Tukey's

CV (%): coeficiente de variação; EPM: erro padrão das médias

CV (IC₅₀) = 63,1; EPM (IC₅₀) = 0,1; *(mg/mL)

Tabela 7 – *Valores médios de atividade antioxidante pelo método FRAP em casca de cebola roxa obtidos por ultrassom com diferentes concentrações de solvente, potências e modos de extração.

Potência (W)	Solvente (%)				Médias
	20	40	60	80	
130	16,71 ^c	63,29 ^b	92,22 ^a	65,77 ^{abB}	59,49
750	17,32 ^c	49,06 ^b	108,01 ^a	108,38 ^{aA}	70,69
Médias	17,02	56,17	100,11	87,07	
Modo (pulsos)	Solvente (%)				Médias
	20	40	60	80	
Contínuo	18,76 ^b	67,16 ^a	85,68 ^{aB}	94,74 ^a	66,58
Pulsado	15,27 ^d	45,19 ^c	114,54 ^{aA}	79,40 ^b	63,60
Médias	17,02	56,17	100,11	87,07	

Médias com a mesma letra minúscula na linha não diferem ($P > 0,05$) teste de Tukey's

Médias com a mesma letra maiúscula na coluna não diferem ($P > 0,05$) teste de Tukey's

CV (%): coeficiente de variação; EPM: erro padrão das médias

CV (FRAP) = 58,8; EPM (FRAP) = 5,5; * $\mu\text{mol TEAC/g}$ casca de cebola roxa

Tabela 8 – *Valores médios de atividade antioxidante pelo método β -caroteno em casca de cebola roxa obtidos por ultrassom com diferentes concentrações de solvente, potências e modos de extração.

Potencia (W)	Modo (Pulsos)		
	Contínuo	Pulsado	Média
130	67,39	70,76	69,07
750	75,25	65,18	70,21
Média	71,32	67,97	

Médias com a mesma letra minúscula na linha não diferem ($P > 0,05$) teste de Tukey's

Médias com a mesma letra maiúscula na coluna não diferem ($P > 0,05$) teste de Tukey's

CV (%): coeficiente de variação; EPM: erro padrão das médias

CV (β -caroteno) = 22,5; EPM (β -caroteno) = 2,3

4 DISCUSSÃO GERAL

As plantas são as fontes mais abundantes de antioxidantes naturais como os compostos fenólicos e tem sido amplamente relatadas com efeitos benéficos neste sentido, contudo, as cascas são rejeitadas e muitas vezes não recebem devida atenção como fonte de antioxidantes. Além disso, os compostos fenólicos podem reagir como antimicrobianos prevenindo o desenvolvimento de patógenos e auxiliando na conservação dos alimentos (TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010).

A extração de compostos bioativos de tecido vegetal é o primeiro passo na utilização de fitoquímicos para elaboração de produtos alimentícios, farmacêuticos e cosméticos. Metanol, etanol, acetona, acetato de etila, e suas combinações têm sido utilizados para a extração de polifenóis, muitas vezes com diferentes proporções de água (DAI & MUMPER, 2010), ocasionando diferentes condições de interações com as matrizes. Neste estudo, utilizou-se o álcool de cereais (etanol) como solvente pelo poder de extração e segurança para o consumo humano, uma vez que é utilizado na indústria alimentar.

Com relação a temperatura de extração, diversos estudos relatam que para uma eficiente extração de antocianinas o processo deve ser conduzido a temperaturas variando de 20 a 50 °C, pois temperaturas acima de 70 °C tem demonstrado causar uma rápida degradação das antocianinas. Diante destas informações, as temperaturas de extração pelo método convencional por agitação e pelo método ultrassom foram fixadas em 25 °C tendo em vista que altas temperaturas aumentam a chance de oxidação dos compostos fenólicos.

Baseado nos resultados encontrados, o conteúdo de compostos fenólicos encontrado nos extratos de casca de cebola roxa obtidos por agitação, micro-ondas e ultrassom apresentaram variação entre 91,9 – 839,3 mg GAE/g de casca de cebola, sendo consideravelmente superiores aos encontrados por Nuutila et al., (2003) que obtiveram valores de 80 mg GAE/g de casca de cebola vermelha e 2.5 mg GAE/g de cebola. Também foram superiores ao de casca de alho, planta do mesmo gênero (*Allium*) que apresentou teores variando entre 13 mg GAE/g de casca de alho (KALLEL et al., 2014) e 0.05-0.98 mg GAE/g de alho (BOZIN et al., 2008). Tal resultado sugere que a casca de cebola roxa é uma matéria-prima com significativo conteúdo de compostos fenólicos.

Os flavonoides são os principais compostos fenólicos em cebolas e podem ser classificados em diferentes subclasses, sendo os flavonóis e antocianinas as principais e o último sendo encontrada apenas em cebolas vermelhas (SLIMESTAD; FOSSEN; VAGEN, 2007). Dados relatados na literatura indicam que o teor de flavonoides da cebola pode variar de acordo com a cultivar, época de crescimento, condições ambientais e agronômicas e, em alguns casos, a região do bulbo analisada. Entretanto, neste estudo os métodos de extração por agitação, micro-ondas focalizada e ultrassom apresentaram teores de flavonoides totais que variaram de 22,6 – 43,8 mg QE/g de casca de cebola roxa corroborando com estudo realizado por Benítez et al (2011) que ao analisar diferentes culturas de cebolas encontrou teor de flavonoides totais de 43,1 mg/ g de casca de cebola marrom seca.

Segundo Rhodes (1996) as antocianinas constituem cerca de 10% do teor de flavonóides totais de cebolas vermelhas e estão fortemente concentradas na casca. Os valores do conteúdo total de antocianinas encontrados neste estudo mediante a extração por agitação, micor-ondas focalizada e ultrassom variaram de 55,5 – 470,2 mg /100g de casca de cebola, sendo superiores aos encontrados por Albishi et al. (2013) e Lauro & Francis (2000) que ao analisar a casca de cebola vermelha relataram um conteúdo de antocianinas totais de $10,04 \pm 0,90$ mg / 100 g de casca e de 7-21 mg / 100 g de cebola, respectivamente.

Com relação aos parâmetros de extração estudados, os extratos obtidos por agitação (convencional) apresentaram maior conteúdo de fenólicos totais, flavonoides totais e antocianinas totais quando utilizado solvente 80% e tempo de extração apartir dos 60 minutos, sendo 165, 60 e 120 minutos, respectivamente. O solvente com polaridade intermediária (etanol/água) facilita a extração de compostos antioxidantes, reforçando assim o resultado visualizado neste trabalho.

Pode-se perceber, de um modo geral, que o tempo eleva a eficiência da extração de compostos bioativos. A extração sólido-líquido depende da taxa de dissolução de compostos e a rapidez com que atingem a concentração de equilíbrio do líquido (GERTENBACH, 2001). No entanto, o tempo de extração prolongado pode ser indesejável uma vez que pode expor os compostos bioativos ao risco de degradação oxidativa (MADHUIJITH; SHAHIDI, 2006).

O mesmo comportamento foi observado para os valores de atividades antioxidantes pelos métodos FRAP, DPPH, β -caroteno e concentração inibitória IC50, com relação a concentração de solvente, demonstrando correlação entre os compostos bioativos extraídos e as atividades antioxidantes encontradas. Os extratos com maiores atividades antioxidantes foram obtidos com

solvente 80% para os métodos FRAP, DPPH, concentração inibitória IC₅₀ e solvente 60% para o método β -caroteno. O tempo prolongado de extração também colaborou para melhor atividade antioxidante dos extratos. No entanto, os valores de IC₅₀ e atividade antioxidante pelo método DPPH não diferiram ($P>0,05$) ao decorrer do tempo de extração sendo assim, o tempo de 30 minutos escolhido. Apesar dos extratos obtidos pelo método de agitação apresentar elevada concentração de compostos bioativos com alta capacidade antioxidante, não foi detectado atividade antimicrobiana frente aos micro-organismos testados em todos os extratos.

Segundo Zou e Liu (2006) a extração assistida por micro-ondas é um processo de extração rápida onde a energia das micro-ondas é eficientemente entregue aos materiais oferecendo uma rápida e eficiente extração dos compostos alvos. De um modo geral, os resultados do presente estudo indicaram que as maiores concentrações de solvente (60 e 80%) foram mais eficazes na extração de compostos bioativos e conseqüentemente para obtenção de extratos com maiores capacidades antioxidantes.

A temperatura de extração é um dos fatores mais importantes que pode afetar a taxa de extração de compostos bioativos. Verificou-se que em temperaturas maiores (70 °C) os teores de fenólicos totais e flavonoides foram mais elevados. As atividades antioxidantes pelo método β -caroteno, ABTS e a concentração inibitória IC₅₀ foram influenciados pela temperatura de extração somente nas concentrações 20, 60 e 40%, sendo que aos 70 °C obtiveram-se extratos com melhores atividades. Já as atividades antioxidantes pelos métodos DPPH e FRAP, o teor de antocianinas totais não foram influenciadas pela temperatura de extração. Segundo Sun et al. (2002) a combinação da alta temperatura com o solvente promove o enfraquecimento e o comprometimento da integridade celular do material vegetal, promovendo uma melhor penetração do solvente na célula e maior extração dos compostos bioativos. Em relação a atividade antimicrobiana os extratos de casca de cebola roxa não apresentaram atividade frente aos micro-organismos testados.

A vantagem de utilizar o ultrassom na extração de compostos bioativos a partir de matriz vegetal tem sido aplicada à inúmeros compostos de interesse, tanto nas indústrias de farmacologia e alimentação. A melhoria observada na extração desses compostos bioativos por ultrassom é atribuída a uma intensificação da transferência de massa, devido o fenômeno de cavitação produzido no solvente pela passagem de uma onda ultra-sônica.

Os resultados indicaram que a potência do ultrassom 130 W, modo pulsado de extração e solvente 60% elevaram a extração de flavonoides totais, antocianinas totais e atividade antioxidante pelos métodos FRAP e β -caroteno. Já para os valores de atividade antioxidante pelo método DPPH somente o solvente 60% influenciou e os valores de atividade antioxidante pelo método ABTS foram maiores com solvente 80%, modo pulsado e 130 W. Para maior poder de inibição de 50% do radical DPPH (IC50) as condições necessárias são 130 W, modo pulsado e 40% de solvente. Quanto a atividade antimicrobiana (dados não mostrados) não foi constatada em nenhum dos extratos testados.

Deste modo, o conteúdo de fenólicos, flavonoides, antocianinas totais e as atividades antioxidantes evidenciadas *in vitro* nos extratos obtidos da casca de cebola roxa através da extração convencional por agitação, micro-ondas focalizada e ultrassom apresentaram potencial para ser utilizados como ingredientes funcionais na elaboração de produtos alimentícios visando prevenir a oxidação e contribuindo para a redução de resíduos agro-industriais.

5 CONCLUSÃO

Em geral com base nos resultados apresentados nos artigos pode-se concluir que:

- ✓ O maior conteúdo de fenólicos totais obtido pelo método de extração convencional por agitação foi utilizando 165 minutos e solvente 80%.
- ✓ Para a extração por micro-ondas focalizada a concentração de solvente 80% e temperatura de 70°C resultaram em maiores teores de fenólicos totais;
- ✓ Utilizando o ultrassom no método contínuo, potência 130 W e solvente 60% obteve-se maior teor de fenólicos totais.
- ✓ Os extratos obtidos pelos métodos de agitação convencional, micro-ondas focalizada e ultrassom demonstraram ausência de atividade antimicrobiana frente aos micro-organismos testados.
- ✓ O conteúdo de fenólicos totais e diante dos valores de atividades antioxidantes *in vitro* encontrados nos extratos de casca de cebola roxa por extração convencional por agitação, micro-ondas focalizadas e sonda ultrasônica sugere um possível uso como antioxidante natural em produtos alimentícios.

REFERÊNCIAS

- BANERJEE, R. et al. Antioxidant effects of broccoli powder extract in goat meat nuggets. **Meat Science**, v. 91, n. 2, p. 179–184, 2012.
- BELITZ, H.D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. **Food Chemistry**, 4th revised and extended ed. XLIV, 1070 p. 2009.
- BENITÉZ, V. et al. Characterization of industrial onion wastes (*Allium cepa* L): Dietary fiber and bioactive compounds. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 66, n. 1, p. 48-57, 2011.
- BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the frap assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996.
- BOZIN, B. et al. Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae). **Food Chemistry**, v. 111, n. 1, p. 925-929, 2008.
- CAMEL, V. Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples. **Trends Anal. Chem.**, v. 19, n. 4, p. 229-247, 2000.
- CAO, Y. et al. Effects of chitosan, aqueous extract of ginger, onion and garlic on quality and shelf life of stewed-pork during refrigerated storage. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 1655–1660, 2013.
- CARRERA, C. et al. Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes. **Anal. Chim. Acta**, v. 732, n. 32, p. 100–104, 2011.
- CASTRO, M. D. L.; CAPOTE, F. P. **Analytical applications of ultrasound**. Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry, v. 26, 413 p. 2007.
- CASTRO, M. D. L.; CAPOTE, F. P. Soxhlet extraction: Past and present panacea. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2383–2389, 2010.
- CASTRO, M. D. L.; GARCIA-AYUSO, L. E. Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. **Analtica Chimica Acta**, n. 369, n. 1-2, p. 1–10, 1998.
- CASTRO, M. D. L.; PRIEGO-CAPOTE, F.; PERALBO-MOLINA, A. The role of ultrasound in analytical derivatizations. **Journal of Chromatography B**, v. 879, p.1189–1195, 2011.
- CECCARELLI, N. et al. Globe artichoke as a functional food. **Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism**, v. 3, n. 3, p.197-201, 2010.
- CHEMAT, F.; HUMA, Z.; KHAN, M. K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, n. 4, p. 813–835, 2011.

CHIATTONE, P. V. **Ácido ascórbico, eritorbato e mistura comercial na redução da oxidação de hambúrguer bovino processado com água ozonizada**. 2010. 124 f. Tese (Doutora em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2010.

DAI, J.; R. J. MUMPER. Plant Phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**, v. 10, n. 15, p. 7313-7352, 2010.

DUARTE-ALMEIDA, J.M. et al. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH•. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

EBRAHIMABADI, A. H. et al. Composition and antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and extracts of *Stachys inflata* Benth from Iran. **Food Chemistry**, v. 119, n. 2, p. 452-458, 2010.

ESCLAPEZ, M. D. et al. Ultrasound-assisted extraction of natural products. **Food Engineering Reviews**, v. 3, n. 2, p.108–120, 2011

ESKILSSON, C. S.; BJORKLUND, E. Analytical-scale microwaveassisted extraction. **J. Chromatogr**, v. 1, n. 90, p. 227-250, 2000.

FRESCO, P. et al. New insights on the anticâncer properties of dietary polyphenols. **Medicinal Research Reviews**, v. 26, n. 1, p. 746-766, 2006.

FURUSAWA, M. et al. A new flavonol glucoside from onion. **Heterocycles**, v. 57, n. 11, p. 2175–2177, 2002.

FURUSAWA, M. et al. Anti-platelet and membrane-rigidifying flavonoids in brownish scale of onion. **Journal of Health Science**, v. 49, n. 6, p. 475–480, 2003.

GALDO'N, R. B.; RODRI'GUEZ, R. E. M.; ROMERO, D. C. Flavonoids in onion cultivars (*Allium cepa* L.). **Journal of Food Science**, v. 73, n. 8, p. 599–605, 2008

GALLO, M. et al. Microwave assisted extraction of phenolic compounds from four different spices. **Molecules**, v. 15, n. 9, p. 6365–6374, 2010.

GERTENBACH, D. D. Solid–liquid extraction technologies for manufacturing nutraceuticals from botanicals. In: Shi, J., Mazza, G., LeMaguer, M. (Eds.), **Functional Foods: Biochemical and Processing Aspects**. CRC Press Inc., Boca Raton, FL, pp. 331–366, 2001.

GHAFOOR, K.; CHOI, Y.; JO, I. H. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds. **J. Agric. Food Chem.** v. 57, n. 11, p. 4988–4994, 2009.

- GONZALEZ, M.; GONZALEZ, V. Sample preparation of tropical and subtropical fruit biowastes to determine antioxidant phytochemicals. **Analytical Methods**, v. 2, n. 12, p. 1842-1866, 2010.
- GRIFFITHS, G. et al. Onions: a global benefits to health. **Phytotherapy Research**, v. 16, n. 7, p. 603–615, 2002.
- HANDA, S. S. An overview of extraction techniques for medicinal and aromatic plants. In: HANDA, S. S. et al. **Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants**. Trieste : United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology (ICS - UNIDO), 2008. 260 p.
- HUANG, W. Y.; CAI, Y.; ZHANG, Y. Natural phenolic compounds from medicinal herbs dietary plants: Potential use for cancer prevention. **Nutrition and Cancer**, v. 62, n. 1, p. 1-20, 2009.
- JAYAPRAKASHA, G. K.; RAO, L. J.; SAKARIAH, K. K. Antioxidant activities od flavidin in different in vitro model systems. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 19, p. 5141-5146, 2004.
- JERMAN, T.; TREBSE, P.; MOZETIC VODOPIVEC, B. Ultrasound-assisted solid liquid extraction (USLE) of olive fruit (*Olea europaea*) phenolic compounds. **Food Chemistry**, v.123, n. 1, p. 175–182, 2010.
- KALLEL, F. et al. Garlic (*Allium sativum* L.) husk waste as a potential source of phenolic compounds: Influence of extracting solvents on its antimicrobial and antioxidant properties. **Industrial Crops and Products**, v. 62, n. 2, p. 34–41, 2014.
- KANCHEVA, V. D. Phenolic antioxidants-radical scavenging and chain breaking activity: a comparative study. **European Journal of Lipid Science and Tecnology**, v. 111, n.2, p. 1072-1089, 2009.
- KAUR, C.; JOSHI, S.; KAPOOR, H. C. Antioxdnats in onion (*Allium cepa* L.) cultivars grown in India. **Journal of Food Biochemistry**, v. 33, n. 2, p. 184–200, 2009.
- KIM, Y. J. The effect of garlic or onion marinade on the lipid oxidation and meat quality of pork during cold storage. **Journal Food Quality**, v. 33, n. 1, p. 171-185, 2010.
- KORNILOVA, O.; ROSELL-MELE, A. Application of microwaveassisted extraction to the analysis of biomarker climate proxies in marine sediments. **Org. Geochem**, v. 34, N. 11, p. 1517-1523, 2003.
- KRICHER, J. **Tropical Ecology**. NewJersey: Princeton University press, Princeton, 744p, 2011.
- LAURO, G. J.; FRANCIS, F. J. **Natural food colours, science and technology**. IFT Basic Symposium Series 14, Marcel Dekker. New York, 2000.

LEE, J.; MITCHEL, A. E. Quercetin and isorhamnetin glycosides in onion (*Allium cepa* L.): Varietal comparison, physical distribution, co-product evaluation, and long-term storage stability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 3, p. 857–863, 2011.

LI, H.; CHEN, B.; YAO, S. Z. Application of ultrasonic technique for extracting chlorogenic acid from *Eucommia ulmoides* Oliv. (*E. ulmoides*) **Ultrason. Sonochem.**, v. 12, n. 4, p. 295–300, 2005.

LIMA, A. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*, e identificação dos compostos fenólicos presentes no pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.)**. 2008. Tese (Doutorado em Bromatologia) - Universidade de São Paulo; São Paulo, 2008.

LUQUE-GRACIA, J. L.; CASTRO, M. D. L. Ultrasound: a powerful tool for leaching. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 1, p. 41-47, 2003.

MADHUJITH, T.; SHAHIDI, F. Optimization of the extraction of antioxidative constituents of six barley cultivars and their antioxidant properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 5, p. 8048–8057, 2006.

MAISUTHISAKUL, P.; SUTTAJIT, M.; PONGSAWATMANIT, R. Assessment of phenolic content and free radical scavenging capacity of some Thai indigenous plants. **Food Chemistry**, v. 100, n.1, p. 1409-1418, 2005.

MANSUR, M. C. P. P. R. **Estudo preliminar das atividades fotoprotetora e antioxidante dos extratos das folhas de *Bauhinia microstachya* var. *massambabensis* Vaz numa formulação antissolar**. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

MARIUTTI, L. R. B. et al. Effect of sage and garlic on lipid oxidation in high-pressure processed chicken meat. **Eur Food Res Technol**, v. 227, n. 2, p. 337-44, 2008.

MATSUI, K. N. **Inativação das enzimas presentes na água de coco verde (*Cocos nucifera* L.) por processo térmico através do microondas**. 2006. 139. f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

MILIC, P. S. et al. Kinetic modeling and optimization of maceration and ultrasound-extraction of resinoid from the aerial parts of white lady's bedstraw (*Galium mollugo* L.). **Ultrasonics Sonochemistry**, v.20, n. 1, p.525–534, 2013.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1-2, p. 95-111, 2004.

NUUTILA, A. M.; KAMMIOVIRTA, K.; OKSMAN-CALDENTEY, K. M. Comparison of methods for the hydrolysis of flavonoids and phenolic acids from onion and spinach for HPLC analysis, **Food Chemistry**, v. 76, n. 4, p. 519–525, 2002.

NUUTILA A. M. et al. Comparison of antioxidant activities of onion and garlic extracts by inhibition of lipid peroxidation and radical scavenging activity. **Food Chemistry**, v. 81, n. 4, p. 485-493, 2003.

OKE, F. et al. Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Satureja cuneifolia* Ten. **Food Chemistry**, v. 112, n. 4, p. 874-879, 2009.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. **Fundamentos de Farmacobotânica e de Morfologia Vegetal**. 3ª Ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 2009. 228 p.

OUFNAC, D. S. et al. Extraction of antioxidants from wheat Bran using conventional solvent and microwave-assisted methods. **Cereal Chem**, v. 84, n. 2, p. 125-129, 2007.

OZVURAL, E. B.; VURAL, H. The effects of grape seed extract on quality characteristics of frankfurters. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 36, n. 4, p. 291–297, 2012.

OZGEN, M. et al. Modified 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 1151-1157, 2006.

PAGANGA, G.; MILLER, N.; RICE-EVANS, C. A. The polyphenol content of fruit and vegetables and their antioxidant activities. What does a serving constitute. **Free Radical Research**, v. 30, n. 2, p. 153–162, 1999.

PAN, X.; NIU, G.; LIU, H. Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves. **Chemical Engineering and Processing**, v. 42, n. 2, p. 129–133, 2003.

PANIWNYK, P. et al. The extraction of rutin from flower buds of *Sophora japonica*. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 8, n. 3, p. 299–301, 2001.

PEREIRA, M. G. **Aplicação de antioxidantes naturais em carne mecanicamente separada (CMS) de ave**. 2009. 128 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

PEREZ-SERRADILLA, J.; LUQUE DE CASTRO, M. Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from wine lees and spray-drying of the extract. **Food Chemistry**, v. 124, n. 4, p. 1652–1659, 2011.

PINGRET, D. A. S. Lab and pilot-scale ultrasound-assisted water extraction of polyphenols from apple pomace. **J. Food Eng.**, v. 111, n. 1, p. 73–8, 2012.

POKORNY, J. Are natural antioxidants better and safer than synthetic antioxidants? **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 109, n.2, p. 642-649, 2007.

PRIEGO-CAPOTE, L.; CASTRO, L. Analytical uses of ultrasound I. Sample preparation. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 9, p. 645-653, 2004.

- PROESTOS, C.; KOMAITIS, M. Application of microwave-assisted extraction to the fast extraction of plant phenolic compounds. **LWT**, v. 41, n. 4, p. 652–659, 2008.
- RAFIEE, Z. et al. Antioxidant effect of microwave-assisted extracts of olive leaves on sunflower oil. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 14, n. 4, p. 1497–1509, 2012.
- RHODES, M. J. C. Physiologically-active compounds in plant foods: an overview. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 55, n. 5, p. 371-397, 1996.
- RIVLIN, R. S. Historical perspective on the use of garlic. **Journal of Nutrition**, v. 131, n. 3, p. 951–954, 2001.
- RODRIGUEZ-ROJO, S. et al. Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents. **Journal of Food Engineering**, v. 109, n. 1, p. 98-103, 2012.
- RUFINO, M. do S. M. et al. Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS.+. **Comunicado on line nº 127** EMBRAPA, 2007.
- RUFINO, M. do S.M. et al. Bioactive compounds and antioxidante capacities of 18 non traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, p. 996-1002, 2010.
- SANTOS, W. J. **Extração de compostos antioxidantes da folha da mangueira (Mangifera indica L.) utilizando CO2 supercrítico, água/etanol**. 2013. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)-Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.
- SELLAPPAN, S.; AKOH, C. C.; KREWER, G. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 8, p. 2432-2438, 2002.
- SERRADILLA, J. A. P.; CAPOTE, F. P.; CASTRO, M. D. L. Simultaneous ultrasoundassisted emulsification-extraction of polar and nonpolar compounds from solid plant samples. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 17, p. 6767-6774, 2007.
- SHAHIDI, F.; NACZK, M. Phenolics in food and nutraceuticals. Boca Raton, FL, USA: CRC Press Inc.. pp. 136–141, 2004.
- SHAN, B. et al. Antibacterial and antioxidant effects of five spice and herb extracts as natural preservatives of raw pork. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 89, n. 11, p. 1879–1885, 2009.
- SHIM, S. M.; YI, H. L.; KIM, Y. S. Bioaccessibility of flavonoids and total phenolic content in onions and its relationship with antioxidant activity. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 62, n. 8, p. 835–838, 2011.
- SLIMESTAD, R.; FOSSEN, T.; VAGEN, I.M. Onions: a source of unique dietary flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 25, p. 10067–10080, 2007.

SHIMOKOMAKI, M. et al. **Atualidades em ciência e tecnologia de carnes**. São Paulo: VARELLA, 2006, 230p.

SHIRSATH, S. R.; SONAWANE, S. H.; GOGATE, P. R. Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations. A review of current status. **Chemical Engineering and Processing**, v. 53, p.10– 23, 2012.

SONG, J. et al. Optimized microwave-assisted extraction of total phenolics (TP) from *Ipomoea batatas* leaves and its antioxidant activity Innov. **Food Sci. Emerg.**, v. 12, n. 3, p. 282–287, 2011.

SOUSA, C. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUZA, M. M de. **Avaliação da atividade antifúngica e antimicotoxinas de extratos de farelo de arroz, cebola e microalga chlorella**. 2008. 150 f. Dissertação (Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2008.

SUN, J. et al. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. **Agric. Food Chem**, v. 50, n. 25, p. 7449-7456, 2002.

TAGHVAEI, M. et al. The effect of natural antioxidants extracted from plant and animal resources on the oxidative stability of soybean oil. **LWT-Food Science and Technology**, v. 56, n. 1, p. 124–130, 2014.

TAJKARIMI, A. M.; IBRAHIM, S. A.; CLIVER, D. Antimicrobial herb and spice compounds in food. **Food Control**, v. 21, n. 9, p. 1199-1118, 2010.

TAKAHAMA, U.; HIROTA, S. Deglucosidation of quercetin glucosides to the aglycone and formation of antifungal agentes by peroxidasedependent oxidation of quercetin on browning of onion scales. **Plant and Cell Physiology**, v. 41, n. 9, p. 1021–1029, 2000.

TERIGAR, B. G. et al. Continuous microwave-assisted isoflavone extraction system: Design and performance evaluation. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 7, p. 2466–247, 2010.

VEILLET, S.; TOMAO, V.; CHEMAT, F. Ultrasound assisted maceration: An original procedure for direct aromatization of olive oil with basil. **Food Chemistry**, v. 123, n. 3, p. 905–911, 2010.

WARNER, K.; NEFF, W. E.; ELLER, F. J. Enhancing quality and oxidative stability of aged fried food with g-tocopherol. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 51, n. 3, p. 623, 2003.

WICZKOWSKI W. et al. Quercetin from shallots (*Allium cepa* L. var. aggregatum) is more bioavailable than its glucosides. **Journal Nutr**, v. 138, n. 5, p. 885–888, 2008.

XIAO, W.; SONG, J.; WANG, G. LI. Microwave-assisted extraction performed in low temperature and in vacuo for the extraction of labile compounds in food samples. **Anal. Chim. Acta**, v. 712, p. 85–93, 2012.

YANG, Y.; ZHANG, F .Ultrasound-assited extraction of rutin and quercitin from *Euonymus alatus* (Thunb.) **Sieb Ultrason. Sonochem.**, v. 15, n. 4, p. 308–313, 2008.

ZIGONEANU, I. G. et al. Determination of antioxidant components in rice bran oil extracted by microwave-assisted method. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 11, p. 4910–4918, 2008.

ZOU, H. Y.; LIU, C. Z. Microwave-assisted extraction of solanesol from tobacco leaves. **Journal Chromatogr A**, v. 1129, n. 1, p. 135-139, 2006.

ZOU, T. B. et al. Response surface methodology for ultrasound-assisted extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. **Marine Drugs**, v. 11, n. 5, p. 1644–1655, 2013.

ANEXO I

International Food Research Journal

(ISSN 22317546)
Tel: 603-89468419 // Fax: 603-89423552
Email: ifrj@upm.edu.my
Website: <http://www.ifrj.upm.edu.my>



Dear Author,

ACCEPTANCE LETTER

The Editorial Team of International Food Research Journal, is pleased to inform you that your manuscript has been accepted for publication. We thank you for your contribution to the International Food Research Journal and encourage you to submit other articles to the Journal.

Please note that all manuscripts must be accompanied by a signed copyright agreement form to enable the manuscript to be processed for publication. You are requested to send the copyright agreement form within three (3) working days from the date of the email. Please print, fill and sign the attached copyright agreement form and send the scanned copy to ifrj@upm.edu.my

Thank you.

Yours sincerely,

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Son Radu".

Professor Dr. Son Radu
Editor
International Food Research Journal