



Bioprospecção da atividade antimicrobiana e antioxidante, in vitro, do extrato hidroalcoólico de *Piptadenia pterosperma* Benth.

Bioprospecting of the antimicrobial and antioxidant activity, in vitro, of hydroalcoholic extract by *Piptadenia pterosperma* Benth.

Recebido em 21/06/2011

Aceito em 05/08/2011

Robéria Lima de Oliveira¹, Márcia Maria Mendes Marques², Ana Raquel Araujo da Silva², Silmária Celestino Costa Santos¹, Sérvio Quesado Junior¹, Maria Izabel Florindo Guedes^{1,2*}

¹Laboratório de Bioquímica, Universidade Estadual do Ceará, Av. Parajana 1700, Campus do Itaperi, 60740-000, Fortaleza, CE, Brasil

²Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual do Ceará, Av. Parajana 1700, Campus do Itaperi, 60740-000, Fortaleza, CE, Brasil

RESUMO

O presente estudo avaliou a atividade antibacteriana e antioxidante do extrato hidroalcoólico das folhas de *Piptadenia pterosperma* e o conteúdo de fenóis totais. Os métodos de difusão em ágar e microdiluição em caldo foram empregados para avaliar a atividade antimicrobiana de *P. pterosperma* contra bactérias Gram (-) e Gram (+). O extrato inibiu o crescimento de *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus*. O método utilizado para avaliar a atividade antioxidante de *P. pterosperma* foi da atividade sequestradora de radicais livres ABTS. O extrato apresentou ação antioxidante estatisticamente semelhante ao antioxidante sintético BHT. Alto teor de compostos fenólicos (338,09 ± 0,002 mg equivalentes de ácido gálico) foi encontrado no extrato, sendo determinado pelo método Folin-Ciocalteu. Observou-se que a atividade antibacteriana e antioxidante de *P. pterosperma* está correlacionada com o teor de compostos fenólicos encontrado no extrato. Portanto, o extrato hidroalcoólico das folhas de *P. pterosperma* é uma fonte potencial de compostos bioativos com propriedade antibacteriana e antioxidante. Agregar valor as folhas de *P. pterosperma* é uma alternativa para sustentabilidade da espécie, uma vez que, a casca é a parte mais utilizada com propósitos medicinais e o uso contínuo acaba destruindo a planta.

Palavras-chaves: Bactérias, fenóis, antioxidante natural

ABSTRACT

The present study evaluated antibacterial activity, antioxidant potential and the phenolic content of hydroalcoholic leaves extract of *Piptadenia pterosperma*. The antimicrobial activity of *P. pterosperma* was screened using Gram-positive and Gram-negative bacteria by diffusion agar and microdilution broth methods. The extract inhibited growth of *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. The antioxidant activity of extract hydroalcoholic was assessed by ABTS free radical scavenging assay and extract exhibit antioxidant activity statistically similar to synthetic antioxidant BHT. The analysis of phenolic content of extract of *P. pterosperma* was performed by the Folin-Ciocalteu method. The antimicrobial and antioxidant activity was correlated with phenolic contents found in extract. Thus, the hydroalcoholic leaves extract of *P. pterosperma* is source potential of bioactive compounds with antioxidant and antibacterial property. Adding value to leaves of *P. pterosperma* is a alternative to the sustainability of specie, since the bark is the most used for medicinal purposes and their continued use destroys the plant.

Keywords: Bacteria, phenols, natural antioxidant

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a ocorrência de bactérias resistentes a antibióticos têm despertado o interesse de pesquisas para o desenvolvimento de novas substâncias anti-microbianas

(Ang *et al.*, 2004). De acordo com Silveira *et al.* (2006), o fenômeno da resistência bacteriana a diversos antibióticos e agentes quimioterápicos impõe sérias limitações às

* **Contato:** Maria Izabel Florindo Guedes, R. Rafael Tobias, 848, Bairro: Edson Queiroz, CE-Brasil, CEP: 60.833-680, Fortaleza, Ceará, Brasil, tel: +85-31019822/ 32476712, e-mail : florinfg@terra.com.br

opções para o tratamento de infecções bacterianas, representando uma ameaça para a saúde pública. Os produtos derivados de plantas vêm ganhando destaque como fonte alternativa de compostos antimicrobianos, como exemplo, extrato de planta rico em compostos fenólicos (Albayrak *et al.*, 2010; Ho *et al.*, 2010; González & Marioli, 2010).

Compostos fenólicos como flavonóides, taninos, antocianinas são também considerados importantes agentes antioxidantes (Elzaawely *et al.*, 2005). Os antioxidantes previnem o dano oxidativo causado por espécies reativas de oxigênio (ROS) (Shahidi *et al.*, 1992). Há um interesse em antioxidantes de ocorrência natural devido ao risco de doenças como câncer, artrite e cardiopatias associadas ao uso indiscriminado de antioxidantes sintéticos, bastante utilizados na indústria alimentícia.

A família *Mimosaceae* possui cerca de 60 gêneros distribuídos em mais de 4.000 espécies encontradas nas regiões tropicais e subtropicais, especialmente nas regiões áridas. Muitas espécies dessa família são utilizadas como planta medicinal (Agra *et al.*, 2008; Nunes *et al.*, 2008) e são fonte de alcalóides, flavonóides, terpenóides e carotenóides (Barbosa-Filho *et al.*, 2008). A *Piptadenia pterosperma* (Benth.) é conhecida popularmente como angico roxo e sua casca é bastante utilizada na medicina popular, considerada adstringente, depurativa, hemostática e usada contra leucorréia e gonorréia (Mors *et al.*, 2000).

Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana e antioxidante do extrato hidroalcoólico das folhas de *Piptadenia pterosperma* Benth. e o teor de compostos fenólicos. A importância desse estudo é justificada pela escassez de pesquisa científica referente à utilização das folhas de *P. pterosperma* com propósito terapêutico.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparação do extrato hidroalcoólico

A matéria-prima, folhas de *Piptadenia pterosperma* utilizada no preparo do extrato hidroalcoólico, foi coletada em propriedade particular localizada no Sítio Jaburu, município de Cariré, Ceará, Brasil. Após a coleta, as folhas (2,802 kg) foram secas à temperatura ambiente em local aberto e sem exposição à umidade. Em seguida, foram trituradas manualmente e submetidas à extração por percolação em solução etanol:água (70:30) durante sete dias. A solução resultante foi filtrada e concentrada a vácuo em evaporador rotatório a 60°C, obtendo-se o extrato hidroalcoólico.

Microorganismos testados

Foram selecionadas cepas de importância patogênica para humanos e/ou animais: *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Proteus mirabilis* (ATCC 25933), *Serratia marcescens* (ATCC 14756), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 9144), provenientes da American Type Culture Collection (ATCC, USA) e adquiridas da Fiocruz. As bactérias foram cultivadas e mantidas em meio BHI (Brain Heart Infusion

Agar) no laboratório de Bioquímica Humana da Universidade Estadual do Ceará.

Triagem fitoquímica

O extrato hidroalcoólico de *P. pterosperma* foi submetido a uma triagem fitoquímica segundo a metodologia proposta por Matos (1997), através de reações químicas que resultam na mudança de cor e/ou formação de precipitado referente a cada classe de substância. Foram verificados os seguintes grupos de metabólitos secundários: fenóis, taninos, antocianinas, antocianidinas, flavonóides e leucoantocianidinas. Todos os testes foram realizados em triplicata.

Determinação de compostos fenólicos

A determinação de compostos fenólicos totais do extrato hidroalcoólico de *P. pterosperma* foi realizada pelo método de *Folin Ciocalteu*, segundo Sousa *et al.* (2007). 100 µL do extrato hidroalcoólico foi misturado com 50 µL do reagente de *Folin-Ciocalteu* e 6 mL de água destilada em tubo de ensaio. Em seguida, foi adicionado a solução 2 mL de Na₂CO₃ a 15% e o volume completado para 10 mL com água destilada. O tubo foi agitado em vortex por 30 segundos e deixado em repouso a temperatura ambiente. Após 2 horas procedeu-se a leitura da amostra a 750 nm em espectrofotômetro. O ensaio foi realizado em triplicata. Os dados de absorbância das amostras foram comparados com uma curva padrão com ácido gálico em diversas concentrações para obter a concentração de fenóis totais e os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por 100 g de amostra.

Atividade antibacteriana

Para avaliação da atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de *P. pterosperma* foram utilizadas dois métodos: difusão em ágar e microdiluição em caldo. O método de difusão em disco foi usado para avaliar a sensibilidade das cepas bacterianas frente ao antibiótico (Tetraciclina). Todos os testes foram realizados em triplicata.

Método de difusão em ágar

Culturas de cada bacteriana foram colocadas em caldo BHI para multiplicação por 24 horas a 37°C. Os inóculos bacterianos (10⁸ UFC/mL) foram semeados em placas de Müller Hinton ágar (MHA) usando o Swab e, em seguida, perfuradas com o auxílio de um tubo de Duham. Um volume de 20 µL, retirado da solução estoque de 125 mg/mL do extrato hidroalcoólico em DMSO, foi adicionado nos poços. As placas foram incubadas a 37°C por 24h, em seguida, foram realizadas as leituras dos halos de inibição formados com o auxílio de um paquímetro (Celiktas *et al.*, 2005).

Ensaio de Microdiluição

Para avaliar a concentração inibitória mínima (CIM) do extrato hidroalcoólico foi utilizado o método de microdiluição em caldo para determinação. Placas de 96 poços foram preparadas por dispersão de 95 µL Müller Hinton caldo (MHB) e 5 µL da suspensão bacteriana. Uma alíquota de 100 µL de diluições sucessivas do extrato (500

- 7,8 µg/mL) foi adicionada em cada poço. Para o controle positivo foi usado 195 µL do meio e 5 µL da suspensão bacteriana. As placas foram incubadas a 37°C por 24h. Após esse período foi realizada a leitura da placa a 620 nm usando o aparelho de ELISA e o valor da CIM foi calculado (Ozturk & Ercisli, 2006).

Método de difusão em disco

O método de Kirby-Bauer, conhecido como método de difusão em disco (NCCLS, 2003) foi utilizado para avaliar a sensibilidade das cepas bacterianas ao antibiótico, usado como controle positivo. Os cultivos bacterianos foram suspensos em solução salina e ajustados em escala de McFarland (1×10^8 UFC/mL). Placas de Petri, contendo meio MHA, foram semeados com o inóculo bacteriano com o auxílio de um Swab. Disco estéril do antibiótico foi depositado em pontos equidistantes sobre o ágar, com o auxílio de uma pinça estéril. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas, e em seguida, foi feita a medida dos halos com o auxílio de um paquímetro. O tamanho dos halos foi comparado com os da tabela aprovada internacionalmente pela NCCLS (2003).

Atividade antioxidante

O método do radical livre ABTS (2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiazoline-6-ácido sulfônico) foi utilizado para avaliar a atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de *P. pterosperma* (Re *et al.*, 1999). Uma solução padrão de ABTS^{•+} (7mM, 5 mL) foi misturada com 88 µL de persulfato de potássio (140 mM). A mistura foi agitada e mantida no escuro por 16h a temperatura ambiente. Após esse período, foi retirado 1 mL e completado o volume para 100 mL, com etanol (PA, Vetec). A absorbância foi lida a 734 nm (obtendo 0,715 nm). Foram preparadas diferentes diluições do extrato hidroalcoólico de *P. pterosperma* (10.000 - 5 µg/mL) sendo retirado 30 µL e adicionado a 3,0 mL da solução de ABTS^{•+}. Após 6 minutos, foi realizada a leitura a 734 nm. A porcentagem de seqüestramento do radical ABTS^{•+} foi calculado de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ Índice de varredura} = 100 \times [(Abs_{ABTS} - Abs_{amostra}) / Abs_{ABTS}]$$

A concentração efetiva (EC₅₀), quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de ABTS em 50%, foi calculada através de uma curva de regressão linear feita no programa Origin 7.0. A análise estatística foi realizada por ANOVA, seguido do teste de Tukey.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise fitoquímica do extrato hidroalcoólico das folhas de *Piptadenia pterosperma* indicou a presença de fenóis, flavanonóis, flavanonas e saponinas. A quantidade de fenóis totais para o extrato foi mensurada pelo método de *Folin Ciocalteu*. Os resultados foram expressos através de uma curva de ácido gálico, $y = 0,0007x + 0,0105$, $R^2 = 0,9879$. De acordo com Vasco *et al.* (2008) uma planta rica em compostos fenólicos apresenta concentração >100 mg

de EAG. A quantidade de fenóis para o extrato de *P. pterosperma* foi de $338,09 \pm 0,002$ mg de EAG, assim o extrato de *P. pterosperma* pode ser considerado rico em fenóis.

Trabalhos na literatura científica demonstram a atividade antibacteriana, *in vitro*, de extratos vegetais ricos em compostos fenólicos. Pereira *et al.* (2009) mostraram que *Mimosa tenuiflora* apresentou atividade antimicrobiana e alto teor de fenóis. Ahmad & Beg (2001) demonstraram a ação antibacteriana do extrato etanólico de várias plantas medicinais indianas ricas em flavonóides e taninos, contra bactérias multiresistentes. A ação antimicrobiana dos extratos e óleos essenciais de plantas foi atribuída à presença de compostos fenólicos (Nascimento *et al.*, 2000).

Após os ensaios da atividade antibacteriana de *P. pterosperma* observou-se que a maior atividade antibacteriana do extrato foi sobre *S. aureus*, seguido por uma moderada atividade sobre *P. aeruginosa*, *P. mirabilis* e *S. epidermidis*. O extrato não apresentou ação inibitória frente *K. pneumoniae* e *S. marcescens*, pois não houve formação de halo (Tabela 1). O método usado neste estudo foi o de difusão em ágar, que segundo Natarajan *et al.* (2005) favorece a expressão da atividade antibacteriana de substâncias ativas presentes em extratos. A ação antimicrobiana de *P. pterosperma* pode ser justificada pelo alto teor de compostos fenólicos presentes no extrato. Também foi observada uma ação antimicrobiana do extrato superior a do antibiótico (Tetraciclina 30µg) frente às cepas de *P. mirabilis* e *S. epidermidis* (Tabela 1), resultados bastante promissores quando se propõe usar extratos vegetais como uma alternativa aos antibióticos.

Estudos demonstram que compostos vegetais com ação antibacteriana mostram-se mais ativos contra cepas Gram-positivas do que Gram- negativas (Delaquis *et al.*, 2002), ação relacionada com a estrutura da parede celular. As cepas Gram-negativas apresentam uma membrana externa que age como barreira impedindo a passagem de certos tipos de antibióticos, enzimas digestivas, detergentes e metais pesados (Tortora *et al.*, 2003) em contraste com a estrutura simples da parede celular das bactérias Gram-positivas. Os resultados obtidos neste estudo comprovam o potencial antimicrobiano do extrato hidroalcoólico das folhas de *P. pterosperma* frente a bactérias Gram-positivas (*S. epidermidis* e *S. aureus*) e Gram- negativas (*P. aeruginosa* e *P. mirabilis*).

Os resultados da CIM, expresso em média em µg/mL, do extrato de *P. pterosperma* estão mostrados na Tabela 1. Michielin *et al.* (2009) estabeleceram que a atividade antimicrobiana de uma planta é alta quando apresenta valor de CIM menor que 500 µg/mL, moderada com valores entre 600 e 1500 µg/mL e baixa atividade acima de 1.600 µg/mL. Portanto, o extrato de *P. pterosperma* possui alta atividade contra *P. mirabilis*, *S. epidermidis* e *S. aureus*.

Para a avaliação da atividade antioxidante foi utilizado o método de seqüestramento de radical livre ABTS com a EC₅₀ expressa em mg/mL. O extrato hidroalcoólico de *P. pterosperma* apresentou ação antioxidante similar ao BHT (Tabela 2), constituindo uma nova fonte de antioxidante natural. Os resultados aqui apresentados estão de acordo

Tabela 1. Determinação do halo de inibição e concentração inibitória mínima (CIM) do extrato *Piptadenia pterosperma* Benth

Microrganismos	ATCC	Halo de inibição (mm)		CIM (µg/mL)
		Extrato	Antimicrobiano	
Gram-negativa				
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13883	-	nt	nt
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15442	11,0	+	nt
<i>Serratia marcescens</i>	14756	-	nt	-
<i>Proteus mirabilis</i>	25933	13,5	-	62,5
Gram-positiva				
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228	12,5	-	62,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	9144	14,0	+	125

(-) não houve inibição; atividade moderada (7-13mm); atividade alta (≥ 14 mm); Antimicrobiano (Tetraciclina 30µg); (+) sensível; (-) resistente; (nt) não testado

com Nunes *et al.* (2008) que correlacionaram a alta atividade antioxidante do extrato clorofórmico de *Mimosa paraibana*, pertencente a família *Mimosaceae*, com a presença de substâncias fenólicas. O consumo de antioxidantes naturais, como os compostos fenólicos presentes na maioria das plantas que inibem a formação de radicais livres, também chamados de substâncias reativas, tem sido associado a uma menor incidência de doenças relacionadas com o estresse oxidativo (Droge, 2002).

Tabela 2. Atividade antioxidante pelo método ABTS

Amostras	ABTS (EC ₅₀ mg/mL)
<i>P. pterosperma</i>	0,312 ± 0,01 ^a
BHT	0,308 ± 0,01 ^a
Quercetina	0,171 ± 0,02 ^b

*Letras minúsculas diferentes representam valores significativamente diferentes ($P < 0,05$); EC₅₀ mg/mL ± desvio padrão.

CONCLUSÃO

Portanto, o extrato hidroalcoólico das folhas de *P. pterosperma* é uma fonte potencial de compostos bioativos com propriedade antibacteriana e antioxidante. Os resultados deste estudo permitem agregar valor as folhas de *P. pterosperma*, tornando-se uma alternativa para sustentabilidade da espécie, uma vez que, a casca é a parte mais utilizada com propósitos medicinais e o uso contínuo acaba destruindo a planta. Trabalhos futuros serão realizados com o intuito de isolar o(s) constituinte(s) ativo(s) do extrato hidroalcoólico da espécie vegetal.

REFERÊNCIAS

Agra MF, Silva KN, Basílio IJLD, França PF, Barbosa-Filho JM. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Rev. Bras. Farmacogn.* 18: 472-508, 2008.

Ahmad I, Beg AZ. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-grugs resistant human pathogens. *J. Ethnopharmacol.* 74: 113-123, 2001.

Albayrak S, Aksoy A, Sağdıç O, Hamzaoglu E. Compositions, antioxidant and antimicrobial activities of *Helichrysum* (*Asteraceae*) species collected from Turkey. *Food Chem.* 119: 114-122, 2010.

Ang JY, Ezike E, Asmar BI. Antibacterial resistance. *Indian J. Pediatr.* 71: 229-239, 2004.

Barbosa-Filho JM, Alencar AA, Nunes XP, Tomas ACA, Sena Filho JG, Athayde Filho PF, Silva MS, Sousa MFV, Da Cunha EVL. Sources of alfa-, beta-, gamma-, delta- and epsilon-carotenes: A twentieth century review. *Rev. Bras. Farmacogn.* 18: 135-154, 2008.

Celiktas Y, Kocabas EEH, Bedir E, Sukan FV, Ozek T, Baser KHC. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chem.* 21: 615-619, 2005.

Delaquis PJ, Stanich K, Girard B, Mazza G. Antimicrobial activity of individual and mixed fraction of dill, cilantro, coriander and *Eucalyptus* essential oils. *Int. J. Food. Microbiol.* 74: 101-109, 2002.

Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82: 47-95, 2002.

Elzaawely AA, Xuan TD, Tawata S. Antioxidant and antibacterial activities of *Rumex japonicus* Houtt. aerial parts. *Biol. Pharm. Bull.* 28: 2225-2230, 2005.

Gonzalez MJ, Marioli J.M. Antibacterial activity of water extracts and essential oils of various aromatic plants against *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American Foulbrood. *J. Invertebr. Pathol.* 104: 209-213, 2010.

Matos FJA. Introdução a Fitoquímica Experimental. 2. ed. Fortaleza: Imprensa Universitária UFC, 1997. 141 p.

Michielin EMZ, Salvador AA, Riehl AS, Smânia Jr A, Smânia EFA, Ferreira SRS. Chemical composition and antibacterial activity of *Cordia verbenácea* extracts obtained by different methods. *Bioresour. Technol.* 100: 6615-6623, 2009.

Mors WB, Rizzini CT, Pereira NA. Medicinal plants of Brazil. 2. ed. Reference Publications, Inc., Algonac, Michigan, 2000. 501 p.

NCCLS (National Committee for Laboratory Standards). Padronização dos testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão. 8 ed. M2-A8, 2003.

Nascimento GGF, Locatelli J, Freitas PCD. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Braz. J. Microbiol.* 31: 247-256, 2000.

Natarajan D, Brito JS, Srinivasan K, Nagamuugan N, Mohanasundari C, Perumal G. Anti-bacterial activity of *Euphorbia Fusiformis*- Arare medicinal Herb. *J. Ethnopharmacol.* 102: 123-126, 2005.

Nunes XP, Mesquita RF, Silva DA, Lira DP, Costa VCO, Silva MVB, Xavier AL, Diniz MFFM, Agra MF. Constituintes químicos, avaliação das atividades citotóxica e antioxidante de *Mimosa paraibana* Barneby (*Mimosaceae*). *Rev. Bras. Farmacogn.* 18: 718-723, 2008.

Ozturk S, Ercisli S. The chemical composition of essential oil and *in vitro* antibacterial activities of essential oil and methanol extract of *Ziziphora persica* Bunge. *J. ethnopharmacol.* 106: 372-276, 2006.

Pereira AV, Lôbo KMS, Bezerra DAC, Rodrigues OG, Athayde ACR, Mota RA, De Lima EQ, Medeiros ES. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Jurema* preta e neem sobre amostras de *Staphylococcus sp.* isolados de mastite em Búfalas. *Arq. Inst. Biol.* 76: 341-346, 2009.

Re R, Pelliegrini N, Protegente A, Pannala A, Yang M, Rice Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad. Biol. Med.* 26: 1231-1237, 1999.

Shahidi F, Janitha PK, Wanasundara PD. Phenolic antioxidant. *Food Sci. Nutr.* 32: 67-103, 1992.

Silveira PG, Nome F, Gesser JC, Mandolesi M. Estratégias utilizadas no combate à resistência bacteriana. *Quim. Nova.* 29: 844-855, 2006.

Sousa CMM, Silva HR, Vieira JRGM, Ayres MCC, Costa CLS, Araújo DS, Cavalcante LCD, Barros EDS, Araújo PBM, Brandão MS, Chaves MH. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Quím. Nova.* 30: 351-355, 2007.

Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Microbiologia. 6. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2003. 827 p.

Vasco C, Ruales J, Kamal Eldin A. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chem.* 111: 816-823, 2008.