

Catarina Ferreira Novo

Atividade antioxidante do alho (*Allium sativum L.*) quando submetido a diferentes processos tecnológicos



Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2018



Catarina Ferreira Novo

Atividade antioxidante do alho (*Allium sativum* L.) quando submetido a diferentes processos tecnológicos



Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2018

Catarina Ferreira Novo

Atividade antioxidante do alho (*Allium sativum* L.) quando submetido a diferentes processos tecnológicos

Atesto a originalidade do trabalho

---

*Catarina Ferreira Novo*

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa  
como parte dos requisitos para obtenção do grau de  
Mestre em Ciências Farmacêuticas.

## **Agradecimentos**

A realização desta monografia não seria possível, nem fazia sentido, sem o apoio e incentivo de pessoas que preenchem a minha vida todos os dias.

Em primeiro lugar, quero agradecer à minha orientadora, a Prof. Doutora Carla Sousa e Silva, por ao longo desta fase ter-se mostrado sempre disponível, por toda a dedicação, paciência e compreensão que sempre teve para comigo. Quero agradecer ainda pela excelente orientação e tempo dispensado.

À Prof. Doutora Ana Cristina Vinha, minha co-orientadora, pela colaboração nesta importante etapa académica, pela disponibilidade e profissionalismo.

Em especial, quero agradecer aos meus pais por me terem proporcionado sempre as bases necessárias para a realização deste sonho. É com o mais sincero orgulho que agradeço, particularmente ao meu pai por todo o enorme esforço, luta e perseverança com que sempre enfrentou as adversidades da vida. Não podia estar mais grata. Um obrigada nunca será o suficiente.

Quero agradecer ao meu namorado todo o apoio, toda a ajuda e compreensão, por ter estado sempre lá e nunca me ter deixado desistir. É um exemplo de excelente companheirismo. Obrigada por teres sempre acreditado em mim.

A toda a comunidade Fernando Pessoa, o meu mais sincero obrigada!

## Resumo

O alho tem sido utilizado ao longo da história para fins medicinais e culinários. Para além do sabor característico que confere aos pratos em que é utilizado, o alho é conhecido pelas suas atividades biológicas, nomeadamente, pela sua capacidade antioxidante. Os compostos bioativos do alho são bem conhecidos por possuírem efeitos benéficos para a saúde, nomeadamente na prevenção de diversas patologias, como por exemplo, doenças cardiovasculares, doenças ateroscleróticas e cancro.

No âmbito da avaliação da atividade antioxidante do alho, foi efetuada a determinação dos teores de fenóis e de flavonoides totais de extratos das diferentes formas de apresentação / partes do alho (bulbo, casca, em pó, comprimidos/cápsulas). Determinou-se também a capacidade antioxidante dos mesmos, através do método do radical DPPH<sup>•</sup> e por redução do íão férrico (FRAP). Foi ainda avaliada a capacidade de captação de espécies reativas (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NO<sup>•</sup>) dos referidos extratos. Por fim, estudou-se a influência da fervura e do congelamento nas propriedades do bulbo.

Concluiu-se, com base nos resultados obtidos, que quanto maior o teor de fenóis totais obtido, maior a capacidade de inibição das espécies reativas (NO<sup>•</sup>, O<sub>2</sub><sup>•-</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) dos diferentes extratos. Embora todos os extratos tenham evidenciado valores significativos de compostos fenólicos e flavonoides, o extrato de alho congelado foi aquele que apresentou uma maior quantidade destes compostos, o que conseqüentemente o torna o extrato com maior capacidade de captação das espécies reativas NO<sup>•</sup>, O<sub>2</sub><sup>•-</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Quanto ao método do radical DPPH<sup>•</sup> e ao método FRAP, obteve-se para o extrato de alho cozido uma maior atividade antioxidante. O extrato de cascas de alho evidenciou uma atividade antioxidante significativa, enquanto que os extratos de comprimidos à base de alho e do condimento de alho picado apresentaram uma menor atividade antioxidante em comparação com a do alho fresco.

**Palavras-chave:** Alho; *Allium sativum*; congelamento; cozimento; cascas de alho; condimento de alho; suplemento de alho; polifenóis; fenólicos; flavonoides; atividade antioxidante; captação de espécies reativas.

## Abstract

Garlic has been used throughout history for medicinal and culinary purposes. Besides the characteristic flavor that it gives to the dishes in which it is used, the garlic is known for its biological activities, namely, for its antioxidant capacity. Garlic bioactive compounds are well known to have beneficial health effects in prevention of various conditions, for example, heart diseases, atherosclerotic diseases and cancer.

In the evaluation of the antioxidant activity of garlic, total phenolic and flavonoid contents of extracts of the different forms of presentation / parts of the garlic (bulb, peel, powder, tablets / capsules) were determined. The antioxidant capacity was also determined by the DPPH<sup>•</sup> radical and the ferric ion reduction (FRAP) method. It was also evaluated the capacity of capture of reactive species (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NO<sup>•</sup>) of said extracts. Finally, the influence of boiling and freezing on the properties of the bulb was studied.

Based on the results obtained, the higher the total phenol content obtained, the greater the inhibition capacity of the reactive species (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO<sup>•</sup>) of the different extracts. Although all the extracts showed significant values of phenolic compounds and flavonoids, the frozen garlic extract was the one that presented a greater amount of these compounds, which consequently makes it the extract with greater capacity of capture of the reactive species O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO<sup>•</sup>.

In relation to DPPH<sup>•</sup> radical method and FRAP method, a higher antioxidant activity was obtained for the extract of cooked garlic. The extract of garlic peels showed a significant antioxidant activity, whereas extracts of garlic tablets and garlic seasoning had a lower antioxidant activity compared to fresh garlic.

**Keywords:** Garlic; *Allium sativum*; freezing; cooking; garlic peels; garlic seasoning; garlic supplement; polyphenols; phenolics; flavonoids; antioxidant activity; capture of reactive species.

## ÍNDICE

<b>Agradecimentos</b> .....	I
<b>Resumo</b> .....	II
<b>Abstract</b> .....	III
<b>Lista de abreviaturas</b> .....	VI
<b>Índice de figuras</b> .....	VIII
<b>Índice de tabelas</b> .....	IX
<b>Capítulo I</b> .....	1
1.1. Introdução.....	1
<b>Capítulo II</b> .....	3
2.1. O alho .....	3
2.1.1. Perspetiva histórica .....	3
2.1.2. Composição qualitativa .....	4
2.1.3. Benefícios para a saúde .....	6
2.1.4. Interação entre alho e medicamentos .....	9
2.1.5. Efeito da fervura e congelamento.....	10
<b>Capítulo III</b> .....	13
3.1. Objetivos .....	13
<b>Capítulo IV</b> .....	14
4.1. Materiais e métodos .....	14
4.1.1. Reagentes.....	14
4.1.2. Amostras.....	15
4.1.3. Preparação dos extratos .....	15
4.1.4. Determinação do teor de humidade.....	15
4.1.5. Determinação de compostos bioativos e da atividade antioxidante .....	16
4.1.5.1. Determinação do conteúdo fenólico total .....	16
4.1.5.2. Determinação do teor de flavonoides total .....	16
4.1.5.3. Determinação da atividade antioxidante.....	17
4.1.5.3.1. Método do radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH*)....	17
4.1.5.3.2. Avaliação do poder antioxidante por redução do ião férrico (FRAP) .....	17
4.1.5.3.3. Capacidade de captação de espécies reativas.....	18

4.1.5.3.3.1. Condições gerais .....	18
4.1.5.3.3.2. Determinação da capacidade de captação do $O_2^{\bullet}$ .....	18
4.1.5.3.3.3. Determinação da capacidade do $H_2O_2$ .....	19
4.1.5.3.3.4. Determinação da capacidade de captação do $NO^{\bullet}$ .....	19
<b>Capítulo V</b> .....	20
5.1. Resultados e discussão .....	20
<b>Capítulo VI</b> .....	33
6.1. Conclusão .....	33
<b>VII. Referências bibliográficas</b> .....	34

## Lista de abreviaturas

**AMP cíclico** (ou cAMP): monofosfato cíclico de adenosina (do inglês *cyclic adenosine monophosphate*)

**BHA**: mistura dos isómeros 2-*tert*-butil-4-hidroxianisol e 3-*tert*-butil-4-hidroxianisol (do inglês *2-tert-butyl-4-hydroxyanisole and 3-tert-butyl-4-hydroxyanisole* (mixture))

**BHT**: hidroxitolueno butilado (do inglês *butylated hydroxytoluene*)

**CFT**: conteúdo fenólico total

**COX**: cicloxigenase

**DAF-2T**: triazolofluoresceína fluorescente (do inglês *4,5-diaminofluorescein triazole*)

**DMSO**: dimetilsulfóxido

**DPPH**: radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (do inglês *1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*)

**EAG**: equivalentes de ácido gálgico

**EC**: equivalentes de catequina

**EQ**: equivalentes de quercetina

**ESF**: equivalentes de sulfato ferroso

**FRAP**: poder antioxidante por redução do ião férrico (do inglês *ferric reducing antioxidant power*)

**GMP cíclico**: monofosfato cíclico de guanosina (do inglês *cyclic guanosine monophosphate*)

**HDL**: lipoproteínas de alta densidade (do inglês *high density lipoprotein*)

**IC<sub>50</sub>**: metade da concentração máxima inibitória (do inglês *half maximal inhibitory concentration*)

**LDL**: lipoproteína de baixa densidade (do inglês *low density lipoprotein*)

**NADH:** dinucleótido de nicotinamida e adenina (do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide*)

**NBT:** azul de nitrotetrazólio (do inglês *nitro-blue tetrazolium*)

**NOC-5:** 3-(aminopropil)-1-hidroxi-3-isopropil-2-oxo-1-triazeno; (do inglês *nitric oxide amine complex*)

**PMS:** metossulfato de fenazina (do inglês *phenazine methosulfate*)

**ROS:** espécies reativas de oxigênio (do inglês *reactive oxygen species*)

**TFT:** teor de flavonoides total

**Tiron:** ácido 4,5-di-hidroxi-1,3-benzenodissulfônico

**Tris:** 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol

**Trolox:** ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Alho ( <i>Allium sativum</i> ).....	5
<b>Figura 2.</b> Esquema que ilustra a libertação da enzima alinase quando ocorre a rutura das células que constituem o alho.....	6

## Índice de tabelas

<b>Tabela 1.</b> Teores de humidade obtidos para as amostras alvo de estudo .....	21
<b>Tabela 2.</b> Conteúdo fenólico total e teor de flavonoides total no alho ( <i>Allium sativum</i> ) e derivados .....	22
<b>Tabela 3.</b> Atividade antioxidante determinada pelo método DPPH <sup>•</sup> para as diferentes amostras de alho ( <i>Allium sativum</i> ) e derivados estudadas.....	26
<b>Tabela 4.</b> Avaliação do poder antioxidante por redução do ião férrico (FRAP) das diferentes amostras de alho ( <i>Allium sativum</i> ) e derivados estudadas .....	28
<b>Tabela 5.</b> Capacidade de captação pelos diferentes extratos do radical superóxido (O <sub>2</sub> <sup>-•</sup> ), do peróxido de hidrogénio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) e do radical óxido nítrico (NO <sup>•</sup> ).....	31

## CAPÍTULO I

### 1.1. Introdução

As especiarias conferem, essencialmente, sabor e aroma aos alimentos, sendo por este facto muito utilizadas no âmbito da culinária. Alguns dos inúmeros exemplos que podem ser referidos dizem respeito à canela, à pimenta, ao alho, entre outros. No entanto, para além do sabor que conferem aos pratos dos quais fazem parte, as especiarias têm vindo a ser cada vez mais procuradas por promoverem a saúde e uma melhor qualidade de vida (Leelarungrayub *et al.*, 2006; Cortés *et al.*, 2017; Seki e Hosono, 2015).

Desde a antiguidade que a medicina recorre à utilização de especiarias e plantas para o tratamento e prevenção de muitas patologias. Por este facto, o alho, mais concretamente, o bulbo da espécie *Allium sativum*, tem vindo a ser investigado extensivamente pelos seus benefícios para a saúde. São atribuídas ao alho várias atividades terapêuticas, sustentadas por inúmeros estudos científicos. Sabe-se, por exemplo, que o alho possui propriedades antioxidantes (Oommen *et al.*, 2003; Banerjee *et al.*, 2003; Ray *et al.*, 2011; Naji *et al.*, 2017), antitrombóticas (Rahman, 2007), anticancerígenas (Tsai *et al.*, 2012; Roy *et al.*, 2016, Huang *et al.*, 2015).

O género *Allium*, do qual o alho faz parte, engloba várias outras espécies, das quais se destacam a cebola, a chalota e o cebolinho. Estes têm vindo a ser muito estudados, tendo despertado grande interesse nas indústrias alimentares ao longo das últimas décadas (Benkeblia, 2005; García-Díez *et al.*, 2017; Cicero *et al.*, 2017; Tocmo *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2017; Lisanti *et al.*, 2015). Esta especial atenção advém da potencial capacidade antioxidante de alguns compostos que fazem parte da sua composição. Uma vez que alguns antioxidantes de natureza sintética, usados na indústria alimentar, como é o caso da mistura dos isómeros 2-*terc*-butil-4-hidroxianisol e 3-*terc*-butil-4-hidroxianisol (BHA), e do hidroxitolueno butilado (BHT), parecem ser nocivos para a saúde, tem vindo a existir uma maior preocupação na pesquisa de antioxidantes naturais (Mancini *et al.*, 2015). Este facto associado a uma crescente consciencialização dos consumidores em relação à segurança dos aditivos alimentares, levou à procura de fontes de antioxidantes alimentares naturais mais seguras (Kallel *et al.*, 2014).

Por outro lado, tem vindo a existir um interesse cada vez maior pelas diferentes preparações comerciais, que incluem, por exemplo, produtos em pó, e que podem ser

utilizadas na elaboração de uma ampla gama de receitas culinárias (Cardelle-Cobas *et al.*, 2009). O alho, para além de ser encontrado comercialmente como especiaria em pó, pode também utilizar-se cru, frito ou cozido, com o objetivo de temperar carnes, molhos, entre outro tipo de alimentos. No entanto, o alho possui uma composição química muito complexa, que difere com a forma em que se encontra (Lanzotti *et al.*, 2014). Produtos com base no alho, tais como manipulados em cápsulas, comprimidos e medicamentos homeopáticos, podem também ser encontrados em ervanárias ou farmácias (Grunwald e Janicke, 2009). No que diz respeito à casca de alho, não existem ainda muitos estudos, uma vez que esta é considerada uma parte não edível. Contudo, há resultados que perspetivam a casca de alho como sendo uma fonte promissora de compostos com atividade antioxidante (Chhouk *et al.*, 2017).

Habitualmente, tanto o alho, como os vegetais em geral, são sujeitos ao processo de cozedura antes do seu consumo. O cozimento é o processo doméstico frequentemente utilizado na preparação dos alimentos, enquanto a congelação é usada para garantir a conservação dos mesmos. Porém, é importante saber que modificações podem ocorrer ao nível da composição química dos mesmos e, conseqüentemente, das propriedades preventivas e curativas que possam eventualmente ter, nomeadamente, investigar a existência de alterações da sua capacidade antioxidante durante os processos comuns de cozimento e congelação (Jiménez-Monreal *et al.*, 2009).

Neste âmbito, este trabalho experimental pretendeu avaliar e comparar o conteúdo fenólico total, o teor de flavonoides total, a atividade antioxidante e a capacidade de captação de espécies reativas de diversas amostras de alho ou com base no alho, nomeadamente, alho cru, alho cozido, alho congelado, casca de alho, alho em pó, utilizado habitualmente como tempero, e ainda comprimidos à base de alho.

A revisão bibliográfica necessária à realização deste trabalho realizou-se entre os meses de novembro de 2016 e janeiro de 2018, através das fontes de pesquisa científicas PubMed, Science Direct e b-On e em motores de busca, tais como o Google Académico. Os critérios utilizados na seleção dos artigos resultantes da pesquisa científica foram o interesse para o tema, limitando a pesquisa a artigos científicos e estudos escritos em inglês e português, com data de publicação inferior a 10 anos ou mais antigos se o conteúdo fosse relevante.

## CAPÍTULO II

### 2.1. O ALHO

#### 2.1.1. Perspetiva histórica

O alho (*Allium sativum* L.) é uma planta bolbosa pertencente ao género *Allium* e à família Liliacea, que inclui também a cebola (*Allium cepa* L.), o alho-porro (*Allium ampeloprasum* L.), a chalota (*Allium ascalonicum* L.) e a cebolinha (*Allium fistulosum* L.) (Harris *et al.*, 2001). A palavra *Allium*, nome latino do alho, é derivada da palavra celta *al*, que significa pungente ou queimação, enquanto *sativum* significa plantado, cultivado ou semeado (Agarwal, 1996).

A origem do alho remonta a aproximadamente 6000 anos. Embora não haja unanimidade, tudo indica que a Ásia é o continente de origem do alho, sendo hoje cultivado e consumido em praticamente todo o mundo. Julga-se que o deserto da Sibéria seja o local exato da sua origem e que mais tarde tenha sido levado por tribos asiáticas nómadas para o Egito. Especula-se ainda que tenha seguido até ao extremo oriente através das rotas de comércio com a Índia, e tenha chegado de igual modo à Europa (Estêvão, 2017).

Durante muitos anos, o alho foi utilizado nas mais diversas situações, entre as quais as reportadas por Corzo-Martínez *et al.* (2007), ao referir a sua ingestão por atletas olímpicos na Grécia, com a função de estimulante, por forma a melhorar o desempenho dos mesmos, e ainda fazendo parte da composição de loções antissépticas na Índia, usadas na lavagem de feridas e úlceras. Em muitas culturas, o alho foi administrado aos operários com o intuito de aumentar a força e a capacidade para o trabalho (Rivlin, 2001).

O interesse pelos potenciais benefícios do alho teve origem na antiguidade, tendo sido um dos primeiros exemplos de plantas utilizadas no tratamento de doenças e na manutenção da saúde a ser documentado (Rivlin, 2001). A primeira citação desta planta foi encontrada no Codex Ebers (1500 aC), um papiro médico egípcio que relata mais de 800 fórmulas terapêuticas, das quais 22 mencionam o alho como remédio útil para uma variedade de doenças, como problemas cardíacos, dor de cabeça, mordidas, vermes e tumores (Block, 1985).

Mais recentemente, a ciência moderna tende a confirmar muitas das crenças das culturas antigas em relação ao alho, definindo mecanismos de ação e explorando o potencial do alho na prevenção e tratamento de muitas doenças (Rivlin, 2001). Hoje em dia, devido há existência de numerosos estudos científicos, sabe-se que o alho possui um amplo potencial terapêutico, por exemplo na redução do colesterol e no desenvolvimento da aterosclerose (Upadhyay, 2017). O alho apresenta efeitos benéficos no tratamento de várias doenças, incluindo o cancro e a diabetes. Durante séculos o alho demonstrou exercer efeitos medicinais substanciais e é hoje considerado um dos melhores alimentos para a prevenção e tratamento de muitas doenças (Bradley *et al.*, 2016).

### 2.1.2. Composição qualitativa

O alho é uma planta herbácea resistente que pode atingir entre 25 a 70 cm de altura. Possui flores cor-de-rosa ou verdes claras, bulbos e bulbilhos, denominados dentes de alho, e ainda caules compridos de cor avermelhada (Grunwald e Janicke, 2009).

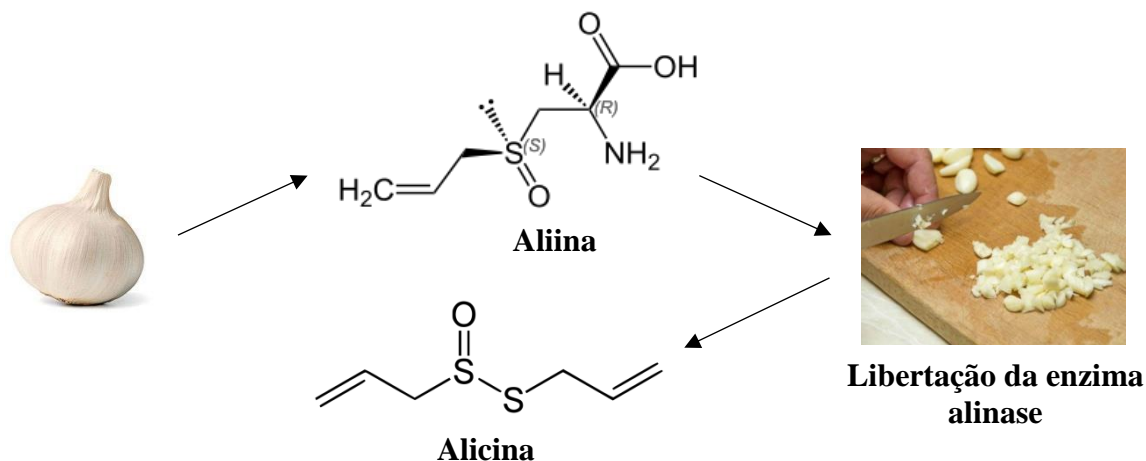


**Figura 1.** Alho (*Allium sativum*) (retirado do site Beleza e Saúde - <https://belezaesaude.com/alho>).

O bulbo é a parte da planta de alho mais comumente utilizada, sendo o local onde se encontram maioritariamente os constituintes ativos, dos quais se destaca a aliina. Quando o alho é triturado ou esmagado, a aliina fica exposta à enzima alinase, formando-se a alicina. Esta última é maioritária responsável pelo odor forte do alho, característico do mesmo (Oomen *et al.*, 2004), tendo sido o primeiro composto de enxofre a ser descoberto (Cavallito e Bailey, 1944). A alicina é responsável por uma ampla gama de atividades

Atividade antioxidante do alho (*Allium sativum* L.) quando submetido a diferentes processos tecnológicos

biológicas. Para além da capacidade em inibir a proliferação de bactérias e fungos, a alicina possui também a capacidade de inibir a proliferação e até mesmo causar a morte de células cancerígenas (Borlinghaus *et al.*, 2014).



**Figura 2.** Esquema que ilustra a liberação da enzima alinase quando ocorre a rutura das células que constituem o alho. Adaptado de <https://www.remedio-caseiro.com/tratamentos-utilizando-o-cha-de-alho/>; <http://m.alunosonline.uol.com.br/quimica/compostos-sulfurados-ou-tiocompostos.html>

A natureza volátil de alguns dos compostos que fazem parte da constituição do bulbo de alho está altamente relacionada com os mecanismos de defesa das plantas de alho contra pragas e inúmeros agentes patogênicos, uma vez que a sua liberação é consequência de danos celulares (Hile *et al.*, 2004).

A composição do bulbo de alho é bastante complexa. Para além de ser maioritariamente composto por água, o seu peso seco é constituído por hidratos de carbono, contendo também proteínas, compostos de enxofre, fibras e aminoácidos livres. Entre os minerais, o alho é conhecido por ter altos níveis de fósforo, seguido de cálcio, ferro, potássio, zinco, selênio, magnésio, sódio e manganês (Rahman, 2003). Possui ainda vitaminas A, C e do complexo B. É considerado uma fonte rica de outros fitonutrientes não voláteis com importantes propriedades medicinais e terapêuticas, sendo dado especial ênfase aos compostos fenólicos, flavonoides, saponinas e sapogeninas, óxidos de azoto, amidas e proteínas (Lanzotti *et al.*, 2014; Rahman, 2003).

Relativamente à composição química das cascas de alho, estas apresentam um baixo teor de lípidos e um alto teor de proteínas, sendo também uma boa fonte de minerais, nomeadamente cálcio, potássio e magnésio (Kallel *et al.*, 2014).

### 2.1.3. Benefícios do alho

O alho é uma planta muito complexa em termos de constituintes ativos com efeito benéfico para a saúde. Em 1858, Louis Pasteur foi o primeiro a observar as propriedades antimicrobianas do alho (Lanzotti, 2006). Mais tarde, em 1932, Albert Schweitzer tratou a disenteria amebiana em África com recurso ao alho. Este foi de igual modo utilizado no tratamento de várias doenças epidémicas, como tifo, cólera, tuberculose e difteria (Bhagyalakshmi *et al.*, 2005). Está ainda descrito que, durante a Segunda Guerra Mundial, se recorreu ao alho para o tratamento de feridas de soldados, ao ser aplicado diretamente sobre as mesmas com o intuito de inibir a propagação de qualquer tipo de infeção (Lanzotti *et al.*, 2014).

Diversos estudos têm demonstrado que o consumo de substâncias antioxidantes na dieta diária pode produzir uma ação protetora efetiva contra os processos oxidativos que ocorrem naturalmente no organismo (Beretta *et al.*, 2017; Bozin *et al.*, 2008; Lenková *et al.*, 2017); Santas *et al.*, 2008). A existência de uma relação inversa entre o consumo de alimentos ricos em antioxidantes e o risco de doenças crónicas, como o cancro e as doenças cardíacas, é hoje uma certeza (Dogan *et al.*, 2017; Kumar e Asdaq, 2017; Palafox-Carlos *et al.*, 2011; Roy *et al.*, 2016). Algumas investigações realizadas com animais e em humanos confirmaram que o alho e os seus derivados têm capacidade para inibir a acumulação de radicais livres no organismo e aumentar a atividade enzimática celular responsável pelos processos antioxidantes (Ray *et al.*, 2011). Contudo, é importante perceber primeiramente o que são e de que forma os compostos antioxidantes exercem os seus efeitos.

A atividade antioxidante característica de muitos tipos de alimentos é, essencialmente, devida à presença de compostos fenólicos que desempenham um papel importante na eliminação de espécies reativas de oxigénio (ROS) (Oliveira *et al.*, 2009). Embora, os radicais livres tenham um papel importante, nomeadamente, na geração de ATP nas mitocôndrias, na destoxificação de xenobióticos pelo citocromo P450, na apoptose de células defeituosas, assim como na luta contra agentes patogénicos (Devasagayam *et al.*, 2004), quando há uma maior produção destas espécies reativas do que a sua neutralização ocorre o stresse oxidativo. Este excesso de radicais livres pode sobrecarregar enzimas protetoras, tais como a superóxido dismutase, a catalase e a peroxidase, dando origem a efeitos celulares destrutivos e letais, que são consequência da

oxidação dos lípidos das membranas celulares, proteínas celulares, ADN e enzimas endógenas (Singh *et al.*, 2009).

Com o intuito de perceber em detalhe o papel dos antioxidantes, têm vindo a ser realizados cada vez mais estudos ao longo do tempo. Por exemplo, Tsai *et al.* (2012) descobriram que estes compostos atuam ao induzir a apoptose e a inibição da ativação e metastização do tumor, bem como através do aumento do controlo e da regulação dos mecanismos imunológicos envolvidos nestas patologias. Segundo Del Rio *et al.* (2010), os compostos fenólicos protegem contra o stresse oxidativo que afeta as membranas celulares e os seus componentes, assim como os ácidos nucleicos. Quando em contacto com células cancerígenas, os compostos fenólicos têm a capacidade de inibir a sua proliferação, particularmente em tumores do estômago e cólon (Dogan *et al.*, 2017; Fratianni *et al.*, 2016). Kodali e Eslick (2015) realizaram uma meta-análise e concluíram, com base na compilação de vários estudos, que o consumo de alho encontra-se associado a uma redução do risco de desenvolvimento de cancro gástrico. Assim sendo, é possível afirmar que existe uma correlação entre o consumo de grandes quantidades de alho e um risco reduzido de desenvolvimento de cancro em diversos órgãos.

De um outro ponto de vista, as infeções bacterianas apresentam atualmente um cenário crítico, uma vez que os antibióticos utilizados como agentes terapêuticos são cada vez menos efetivos, essencialmente devido às resistências adquiridas aos fármacos sintéticos. Posto isto, as propriedades antimicrobianas do alho podem ser exploradas como uma alternativa às preparações farmacêuticas mais comuns, visto que este apresenta um desempenho efetivo contra bactérias resistentes a antibióticos habitualmente usados a nível clínico (Bilal *et al.*, 2016; Johnson *et al.*, 2016; Lemar *et al.*, 2005; Nejad *et al.*, 2014; Shakurfow *et al.*, 2015). Numa investigação realizada por Fratianni *et al.* (2016), os extratos de alho alvo de estudo demonstraram possuir atividade antimicrobiana contra bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

O consumo de alho pode estar de igual forma associado a uma diminuição dos níveis de colesterol no sangue. Estudos em humanos revelaram que o consumo de alho diminui os níveis das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), o que conseqüentemente ajuda a prevenir o aparecimento de doenças cardiovasculares (Tsai *et al.*, 2012).

Outra propriedade encontrada no alho é a sua capacidade de reduzir a agregação plaquetária, dado que a alicina, além de impedir a atividade da cicloxigenase (COX), pode também atuar através da diminuição do monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) e do monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), bem como através da redução da habilidade das plaquetas para se ligarem ao fibrinogénio conseguida pela interação direta com os recetores GPIIb/IIIa (Rahman, 2007). Beretta *et al.* (2017) avaliaram a atividade antiplaquetária de seis espécies pertencentes à família *Allium*, destacando-se o alho, uma vez que demonstrou ser o inibidor plaquetário mais potente.

Já no início deste século havia evidências clínicas que sugeriam que a adição de alho a um regime alimentar diário podia ajudar a reduzir os factores de risco associados às doenças cardiovasculares (Banerjee e Maulik, 2002). Outro estudo mais recente permitiu obter mais evidências pré-clínicas e clínicas de que o alho reduz os riscos associados às doenças cardiovasculares, diminuindo o colesterol, inibindo a agregação plaquetária e reduzindo a pressão arterial (Bradley *et al.*, 2016).

O alho tem efeitos benéficos ao nível das doenças ateroscleróticas, apresentando de facto uma ação positiva sobre os fatores de risco associados à aterosclerose (Mohammadi e Oshaghi, 2014). Segundo um estudo de Durak *et al.* (2002), o alho demonstrou a sua habilidade para prevenir reações de oxidação, eliminando, assim, o stresse oxidativo presente em doentes ateroscleróticos.

Kumar *et al.* (2013) avaliaram a redução dos níveis de glicemia em jejum e glicemia pós-prandial num grupo de doentes medicados com Metformina<sup>®</sup> e num outro com doentes medicados com o mesmo fármaco em conjugação com o consumo de alho. Concluiu-se que, em ambos os grupos alvo de estudo, houve uma redução significativa nos níveis sanguíneos de glicemia em jejum e glicemia pós-prandial, embora tenha ocorrido uma maior percentagem de redução no grupo de doentes medicados com Metformina<sup>®</sup> em associação com o consumo de alho, o que justifica as propriedades anti-hiperglicémicas atribuídas a este último.

Nos dias de hoje existe um interesse crescente no uso de vegetais desidratados como ingredientes alimentares (Gamboa-Santos *et al.*, 2012), nomeadamente cebola e alho desidratados, que podem ser usados na elaboração de uma ampla gama de géneros alimentícios. Dependendo da preparação, os efeitos benéficos podem ser mais ou menos

Atividade antioxidante do alho (*Allium sativum* L.) quando submetido a diferentes processos tecnológicos

intensos, uma vez que a composição do alho pode variar de acordo com as condições de processamento e/ou armazenamento (Cardelle-Cobas *et al.*, 2009).

Apesar de existirem estudos que comprovem a capacidade anticolesterolémica do alho, existiam poucas evidências de que o alho em pó possui também a capacidade de diminuir os níveis de colesterol. No entanto, Sobenin *et al.* (2016) comprovaram que o consumo de alho em pó evita o desenvolvimento de aterosclerose induzida por um elevado valor do colesterol total.

O bulbo do alho fresco também evidencia ter outros benefícios relativamente ao desidratado. Por exemplo, o extrato de alho fresco tem uma eficácia maior do que o extrato de alho em pó na inibição do crescimento da *Candida albicans*. À medida que as concentrações de ambos os extratos aumentaram, as taxas de crescimento da *Candida albicans* diminuíram (Lemar *et al.*, 2002).

Uma vez que a parte edível do alho é o bulbo, os benefícios para a saúde das cascas de alho não foram ainda muito bem estudados. No entanto, já existem estudos com informações acerca da sua composição química e ainda alguns autores que lhes atribuem algumas atividades (Kallel *et al.*, 2014; Ichikawa *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2015). Ichikawa *et al.* (2003) descobriram que o extrato de cascas de alho possui uma forte atividade de eliminação do DPPH, tendo sido os primeiros a identificar seis derivados fenilpropanóides como constituintes antioxidantes primários do extrato. Um estudo levado a cabo por Ifesan *et al.* (2014) demonstrou que os extratos etanólicos de casca de alho possuem atividade antioxidante e antimicrobiana quando usados no tempero de carne cozida. É de salientar que, com base nas investigações realizadas, as cascas de alho são uma fonte promissora de antioxidantes naturais passíveis de serem utilizados em diferentes aplicações alimentares e medicinais.

#### **2.1.4. Interação entre o alho e alguns fármacos**

A ingestão simultânea de alho e alguns medicamentos pode originar alterações farmacocinéticas destes últimos, podendo levar a que não exerçam a sua ação de forma adequada (Tsai *et al.*, 2012). Alguns dos compostos presentes no alho têm a capacidade de modificar profundamente os perfis de plasma do princípio ativo, o que pode levar a

falhas terapêuticas ou efeitos colaterais indesejados e ainda a toxicidade (Berginc *et al.*, 2010).

Por exemplo, os doentes que fazem uma terapêutica diurética com hidroclorotiazida (usada no tratamento de problemas urinários) não deverão consumir alho, uma vez que o seu consumo poderá levar a que ocorra um aumento do efeito diurético do fármaco (Asdaq e Inamdar, 2009).

Por sua vez, um estudo clínico mostrou que o consumo concomitante, a longo prazo, de Saquinavir® e suplementos de alho, pode causar uma diminuição significativa da extensão da absorção do fármaco, evidenciando um impacto profundo dos constituintes do alho na regulação transcricional, translacional e/ou pós-tradução do transportador e/ou expressão enzimática e, portanto, sobre a eficácia terapêutica deste medicamento (Berginc *et al.*, 2010). Piscitelli *et al.* (2002) também já tinham estudado os efeitos derivados do consumo de suplementos de alho na farmacocinética do Saquinavir®. O uso prolongado de suplementos de alho levou a um declínio significativo nas concentrações plasmáticas de Saquinavir®, um inibidor da protease HIV-1.

### **2.1.5. Efeitos do aquecimento e congelamento**

Os vegetais são geralmente cozidos antes do seu consumo. Porém, esta prática pode alterar as suas propriedades físicas e químicas, nomeadamente, ao nível dos compostos antioxidantes e fitoquímicos, como fenólicos totais e flavonoides (Ali *et al.*, 2015; Turkmen *et al.*, 2005).

Na maioria dos casos, o cozimento quebra os vegetais mais delicados e destrói muitos dos seus nutrientes. Cozer os vegetais em água leva a uma perda considerável de vitaminas hidrossolúveis e a alterações na composição química dos mesmos (Ali *et al.*, 2015).

No entanto, o efeito do tratamento térmico depende do vegetal e do método de cozimento. Por exemplo, o conteúdo fenólico total (CFT) dos tomates não é significativamente alterado quando estes são sujeitos ao processo de fervura ou cozimento, mas é consideravelmente reduzido quando os tomates são fritos (Sahlin *et al.*, 2004). A quantidade de fenólicos totais aumentou no caso do feijão verde e do espinafre,

quando estes vegetais foram sujeitos ao processo de fervura usando o microondas. No entanto, o efeito oposto foi verificado para a abóbora, ervilha e alho-porro. A atividade antioxidante aumentou para a abóbora, feijão verde, brócolos e espinafre, e diminuiu para as ervilhas com todos os três métodos de preparação culinária (vaporização, fervura e microondas) (Turkmen *et al.*, 2005).

Existem alguns estudos que comparam os compostos bioativos e o potencial antioxidante do bulbo do alho fresco e cozido (Gorinstein *et al.*, 2005; Ali *et al.*, 2015). Os autores concluíram que a diferença entre a atividade biológica do alho depende do método de cozimento, da temperatura e do tempo. Segundo Queiroz *et al.* (2014), o processamento térmico do alho diminui tanto os compostos bioativos, quanto a sua capacidade antioxidante.

Cavagnaro *et al.* (2007) decidiram analisar a atividade antiagregante plaquetária *in vivo* induzida pelos extratos de diferentes amostras de alho (dentes de alho esmagados *versus* dentes de alho intactos), as quais foram previamente submetidas ao processo de aquecimento, recorrendo-se a diferentes métodos e temperaturas de cozimento. Tanto o aquecimento em forno a uma temperatura de 200°C, como a imersão em água fervente durante 3 minutos, não afetaram a capacidade das amostras de alho esmagado e não esmagado para inibir a agregação plaquetária. Por sua vez, o aquecimento por 6 minutos nas mesmas condições descritas anteriormente suprimiu completamente a atividade antiagregante da amostra de alho não esmagado. O mesmo não se verificou nas amostras previamente esmagadas, apesar de se ter evidenciado uma atividade antiplaquetária reduzida. A incubação prolongada por mais de 10 minutos a esta temperatura (200°C) eliminou completamente a atividade antiagregante de todas as amostras. Isto permite concluir que, à medida que se aumenta a temperatura de aquecimento para o alho, a sua capacidade para inibir a agregação plaquetária vai diminuindo.

Sabe-se que o cozimento pode levar a uma perda considerável de compostos fenólicos. Tanto os extratos químicos, como os extratos enzimáticos de alho cozido, apresentaram menor potencial antioxidante do que os seus homólogos frescos, o que deverá estar relacionado com a destruição de compostos fenólicos por ação do calor (Bhatt e Patel, 2013). Gorinstein *et al.* (2008) já tinham também quantificado diferentes compostos bioativos do alho, antes e depois de vários tratamentos térmicos, e concluíram que o calor origina a destruição de compostos fenólicos.

O congelamento é uma técnica de preservação amplamente utilizada para alimentos, incluindo-se os vegetais e algumas frutas. Contudo, este processo de conservação pode destruir a sua estrutura celular. Um estudo realizado por Li *et al.* (2015) mostrou que o congelamento pode afetar a qualidade do alho preto, evidenciando resultados em que o congelamento durante 30 horas tem o maior impacto, reduzindo os níveis de açúcares.

El-Hadidy *et al.* (2014) realizaram estudos em duas variedades de cebola (Giza 6 e Proton). Os resultados dos estudos levados a cabo em folhas e bulbos de cada variedade indicaram que houve uma diminuição ligeira da pungência e da atividade antioxidante, avaliada pelo método do DPPH, após o seu congelamento durante 3 meses.

## **CAPÍTULO III**

### **3.1. Objetivo**

O objetivo deste trabalho experimental inclui a determinação do conteúdo fenólico total e do teor de flavonoides total, bem como das propriedades antioxidantes de extratos das diferentes formas de apresentação / partes do alho existentes no mercado (bulbo, em pó e em comprimidos/cápsulas), pelo método do radical DPPH<sup>•</sup> e pela avaliação do poder antioxidante por redução do íon férrico (FRAP). Avaliou-se ainda a capacidade de captação de espécies reativas (O<sub>2</sub><sup>-•</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NO<sup>•</sup>) dos mesmos extratos. Por último, pretendeu-se comparar a atividade biológica, recorrendo aos mesmos métodos, das várias formas de apresentação / partes do alho existentes no mercado com a das cascas de alho, consideradas por norma resíduos, tendo também em conta algumas variáveis que podem influenciar as propriedades do bulbo fresco, nomeadamente, a fervura e o congelamento.

## CAPÍTULO IV

### 4.1. Materiais e métodos

#### 4.1.1 Reagentes

No decurso deste trabalho experimental, e para a realização das diferentes metodologias abaixo referidas, foram utilizados os seguintes reagentes de grau analítico:

- 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH<sup>\*</sup>);
- 2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol (Tris);
- 3-(Aminopropil)-1-hidroxi-3-isopropil-2-oxo-1-triazeno (NOC-5);
- Ácido 4,5-di-hidroxi-1,3-benzenodissulfónico (Tiron);
- Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox);
- Ácido ascórbico;
- Ácido clorídrico (HCl);
- Ácido gálgico (C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>5</sub>);
- Carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>);
- Catequina (C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>);
- Cloreto de alumínio (AlCl<sub>3</sub>);
- Cloreto de azul nitrotetrazólio (NBT);
- Dimetilsulfóxido (DMSO);
- Dinucleótido β-nicotinamida adenina (NADH);
- Hidróxido de sódio (NaOH);
- Metossulfato de fenazina (PMS);
- N,N'-Dimetil-9,9'-biacridinio dinitrato (Lucigenina);
- Nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>);
- Quercetina;
- Reagente fenol de Follin-Ciocalteu;
- Sulfato ferroso (FeSO<sub>4</sub>).

#### **4.1.2. Amostras**

Os bulbos de alho, de origem portuguesa e com calibre 40/60 mm, foram adquiridos numa superfície comercial do distrito do Porto, no mês de dezembro de 2016. Os comprimidos de alho “BioActivo Alho – Coração saudável” (300 mg de alho) são da marca Pharma Nord. O condimento alho picado usado é da marca Margão.

À exceção da casca de alho e do condimento de alho picado, todas as amostras foram previamente trituradas.

No caso da amostra de alho congelado, a mesma sofreu um processo prévio de congelação a  $-70^{\circ}\text{C}$  durante 16 dias, antes da preparação do respetivo extrato. Já no caso do alho cozido, deixaram-se 10 g de alho triturado em 200 mL de água em ebulição durante 15 minutos, filtrando-se de seguida o alho, que foi posteriormente usado para a preparação do extrato.

#### **4.1.3. Preparação dos extratos**

Para a preparação dos extratos usou-se uma mistura de etanol/água 1:1 (v/v). Prepararam-se extratos de 0,5 g de amostra com 25 mL de solvente, deixando-se a mistura, com agitação, durante 30 minutos, a  $40^{\circ}\text{C}$ . Conservaram-se os sobrenadantes a uma temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$  até posterior utilização.

#### **4.1.4. Determinação do teor de humidade**

O teor de humidade das amostras foi determinado instrumentalmente, recorrendo a uma balança de determinação da humidade de marca Ohaus, modelo MB35Halogen. Aproximadamente 1g de amostra seca e moída foi sujeita a um processo de secagem (+/-  $100^{\circ}\text{C}$ ) até atingir um peso constante. A análise foi efetuada em triplicado a cada uma das amostras e os resultados expressos em percentagem (%).

#### **4.1.5. Determinação de compostos bioativos e da atividade antioxidante**

##### **4.1.5.1. Determinação do conteúdo fenólico total**

O conteúdo fenólico total foi determinado por um método espectrofotométrico, utilizando-se o reagente de Folin-Ciocalteu (Vinha *et al.*, 2015). Na presença deste, os polifenóis atuam como agentes redutores, ocorrendo reações de oxidação-redução, das quais resulta a formação de um complexo de cor azul, com um máximo de absorção a 765 nm. Com efeito, a 500 µL de extrato adicionaram-se 2,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu a 2 N (diluição de 10x). De seguida, adicionaram-se 2 mL duma solução de carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) a 7,5%. Deixou-se a mistura reagir num banho de água, ao abrigo da luz, a uma temperatura de 45°C, durante 15 minutos. Arrefeceu-se a mistura durante 30 minutos à temperatura ambiente e procedeu-se à leitura da absorvência a 765 nm num espectrofotómetro. O ensaio foi realizado em triplicado. Como padrão utilizou-se uma solução de ácido gálgico. A correlação entre a absorvência da amostra e a concentração do padrão (ácido gálgico) foi obtida através duma curva de calibração. Os resultados obtidos foram expressos em miligramas de equivalentes em ácido gálgico (EAG) por grama de extrato (mg EAG/g de extrato seco).

##### **4.1.5.2. Determinação do teor de flavonoides total**

O teor de flavonoides total foi determinado através da realização de um ensaio colorimétrico, baseado na formação de complexos flavonoíde-alumínio (cor rosa), os quais apresentam um máximo de absorção a 510 nm (Rodrigues *et al.*, 2013). Com efeito, a 30 µL de extrato adicionaram-se 75 µL de água destilada e 45 µL de solução de nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>) a 1%. Após 5 minutos de reação, adicionaram-se 45 µl de uma solução de cloreto de alumínio (AlCl<sub>3</sub>) a 5% e aguardou-se 1 minuto. Por fim, adicionaram-se 60 µL de hidróxido de sódio (NaOH) e 45 µL de água destilada. As leituras foram efetuadas a 510 nm num espectrofotómetro. Utilizou-se como padrão uma solução de catequina em diferentes concentrações, de modo a traçar uma curva de calibração. Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de catequina (EC) por grama de extrato seco (mg EC/g de extrato seco).

#### **4.1.5.3. Determinação da atividade antioxidante**

##### **4.1.5.3.1. Método do radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH<sup>•</sup>)**

Na presença de compostos antioxidantes, a redução na concentração de DPPH<sup>•</sup> é controlada por absorvência a um comprimento de onda específico. Na sua forma radicalar, o DPPH<sup>•</sup> absorve entre 514 a 517 nm, no entanto, após a sua redução por um agente antioxidante, ocorre descoloração, passando de violeta a amarelo (Rodrigues *et al.*, 2013).

A mistura reacional foi feita numa placa de 96 poços, onde foram adicionados 30 µL de amostra e 270 µL de DPPH<sup>•</sup>. Prepararam-se soluções com diferentes concentrações (2,5 – 100 ppm) deste composto, diluídas em etanol absoluto. Após um período de incubação de 40 minutos, à temperatura ambiente e no escuro, a absorvência foi medida a 517 nm, num leitor de microplacas Synergy HT Reader (BioTek Instruments, Synergy HT GENS5, USA). A curva de calibração foi obtida a partir da solução mãe de Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico), utilizado como controlo positivo. Os resultados foram expressos como percentagem da redução do DPPH<sup>•</sup> a difenil-picril-hidrazina. A capacidade antioxidante foi expressa em IC<sub>50</sub> (concentração inibitória, *in vitro*, para diminuir 50% da quantidade do radical livre DPPH<sup>•</sup>), calculada através da curva de percentagem de inibição.

##### **4.1.5.3.2. Avaliação do poder antioxidante por redução do ião férrico (FRAP)**

Este método é caracterizado pela redução do complexo Fe(III)/ferricianeto [ $\text{FeCl}_3/\text{KFe}(\text{CN})_6$ ] à forma ferrosa, pela presença de um composto antioxidante na solução, em meio ácido. Esta reação origina a formação de um complexo de cor azul intensa (Costa *et al.*, 2014).

Adicionaram-se 90 µL de extrato a 270 µL de água destilada e 2,7 mL de reagente FRAP (10 mL de tampão acetato 0,3 M, 1 mL de solução TPTZ 10 mM e 1 mL de cloreto férrico 20 mM). Homogeneizou-se a solução e colocou-se em banho-maria a 37°C, durante 30 minutos. Após incubação, as absorvências foram lidas a 595 nm num leitor de microplacas Synergy HT Reader, (BioTek Instruments, Synergy HT GENS5, USA). Utilizou-se sulfato ferroso a 1 Mm como padrão, para a obtenção de uma curva de

Atividade antioxidante do alho (*Allium sativum* L.) quando submetido a diferentes processos tecnológicos  
calibração. A atividade antioxidante foi expressa em IC<sub>50</sub> (%), calculada através da curva de percentagem de inibição.

#### **4.1.5.3.3. Capacidade de captação de espécies reativas**

##### **4.1.5.3.3.1. Condições gerais**

Os seguintes ensaios estão de acordo com Chisté *et al.* (2011). Os diferentes extratos, depois de liofilizados, foram dissolvidos em tampão fosfato e testados a diferentes concentrações, em triplicado. Os resultados foram apresentados em IC<sub>50</sub> (concentração inibitória, *in vitro*, para diminuir 50% da quantidade de espécies reativas nos meios testados), calculados através da curva de percentagem de inibição.

##### **4.1.5.3.3.2. Determinação da capacidade de captação do O<sub>2</sub><sup>•-</sup>**

O radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) foi gerado através do sistema não-enzimático NADH/PMS/O<sub>2</sub>, sendo que a capacidade de captação do radical superóxido foi determinada espectrofotometricamente no leitor de microplacas, através da monitorização do efeito do composto em estudo na redução do NBT, induzida pelo O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, formando um *diformazan* de cor roxa. A monitorização foi realizada no leitor de Microplacas Synergy HT a 560 nm, a cada 2 minutos, num tempo total de 6 minutos.

As misturas reacionais nos poços da microplaca continham os seguintes reagentes nas concentrações finais indicadas (num volume final de 300 µL): NADH 166 µM (50 µL), NBT 43 µM (150 µL), 50 µL de solvente (para o branco e controlo) ou dos extratos testados a diferentes concentrações ou dos extratos testados a diferentes concentrações e PMS 2,7 µM (50 µL). NADH, NBT e PMS foram dissolvidos em tampão fosfato 19 mM, pH 7,4. Não se observou efeito direto entre DMSO e O<sub>2</sub><sup>•-</sup> nas presentes condições de ensaio. Utilizaram-se 3 controlos positivos: uma solução de quercetina, uma solução de ácido ascórbico e uma solução de Tiron. Os resultados foram expressos como percentagem de inibição da redução de NBT para *diformazan*. Por fim, calculou-se o IC<sub>50</sub> da atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres.

#### **4.1.5.3.3.3. Determinação da capacidade de captação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

A capacidade de captação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi medida monitorizando o efeito dos extratos e padrões testados na oxidação da lucigenina induzida pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. As misturas reacionais na microplaca continham os seguintes reagentes nas concentrações finais indicadas (volume final de 250 µL): tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 (91,5 µL); 50 µL de solvente (para o branco e controlo) ou dos extratos testados a diferentes concentrações, dissolvidos em tampão fosfato 19 mM, pH 7,4; lucigenina 800 µM (100 µL), dissolvida em tampão Tris-HCl 50 mM; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1% (8,5 µL). O sinal de quimiluminescência foi detetado no leitor de microplacas durante 5 minutos. Os resultados foram expressos como percentagem de inibição da oxidação da lucigenina induzida pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Como controlos positivos foram utilizadas duas soluções: uma solução de quercetina e uma de ácido ascórbico. Calculou-se o IC<sub>50</sub> da atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres.

#### **4.1.5.3.3.4. Determinação da capacidade de captação do NO\***

A capacidade de captação do NO\* foi medida através da monitorização do efeito do extrato no NO\*, pela inibição da formação de triazolofluoresceína fluorescente (DAF-2T), a partir da DAF-2 não fluorescente. O NO\* foi gerado pela decomposição de NOC-5. As misturas de reação continham os seguintes reagentes nas concentrações finais (volume final de 300µL): DAF-2 5 µM (200 µL), 50 µL de solvente (para o branco e controlo) ou dos extratos testados a diferentes concentrações, NOC-5 10 µM (50 µL). Os reagentes DAF-2 e NOC-5 foram dissolvidos em tampão fosfato 50 mM, pH 7,4. O sinal de fluorescência foi detetado no leitor de microplacas após um período de incubação de 30 minutos, a uma temperatura de 37°C, com comprimento de onda de emissão a 528 ± 20 nm e de excitação a 485 ± 20 nm. Os resultados foram expressos como percentagem de inibição da oxidação de DAF-2 induzida por NO\*. Como controlos positivos foram utilizadas duas soluções: uma solução de quercetina e uma de ácido ascórbico. Por fim, calculou-se o IC<sub>50</sub> da atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres.

## CAPÍTULO V

### 5.1. Resultados e discussão

#### Determinação do teor de humidade:

O teor de humidade é um fator importante, pois está relacionado com a estabilidade do produto alimentar, bem como com a sua qualidade e composição. Quanto menor o teor de humidade, maior o tempo de vida útil de um alimento (Madrona e Almeida, 2008), pois há menor crescimento de microrganismos.

**Tabela 1.** Teores de humidade obtidos para as amostras alvo de estudo.

<u>Amostras</u>	% Humidade
<i>Bulbo de alho picado</i>	63,11
<i>Alho picado congelado</i>	61,93
<i>Comprimidos à base de alho</i>	5,37
<i>Cascas de alho</i>	17,8
<i>Condimento de alho picado</i>	4,62
<i>Alho cozido</i>	84,78

Pela análise da tabela 1, pode ver-se que os valores obtidos variam entre 4,62% e 84,78% para as amostras alvo de estudo. A percentagem de humidade foi inferior para a amostra de condimento de alho picado, tendo-se obtido um valor de 4,62%. Por sua vez, a amostra de alho cozido foi a que apresentou uma maior percentagem de humidade, com um valor de 84,78%.

### Determinação de compostos bioativos:

Os compostos bioativos são compostos que se encontram presentes naturalmente nos alimentos e que apresentam diversas propriedades benéficas para a saúde. Estas propriedades estão relacionadas principalmente com os compostos antioxidantes (Biesalski *et al.*, 2009), os quais se caracterizam por inibir a ação dos radicais livres, evitando assim o aparecimento de inúmeras patologias (Silva *et al.*, 2017).

Estes compostos dividem-se em grupos distintos com características igualmente diferentes, entre os quais se encontram os compostos fenólicos. Estes são subdivididos noutras classes, das quais fazem parte os flavonoides (Biesalski *et al.*, 2009).

Na tabela 2 estão apresentados o conteúdo fenólico total (CFT) e o teor de flavonoides total (TFT) presentes nas diferentes amostras utilizadas neste estudo.

**Tabela 2.** Conteúdo fenólico total e teor de flavonoides total no alho (*Allium sativum*) e derivados. Média  $\pm$  Desvio Padrão (n=3).

<i>Amostras</i>	Fenólicos totais	Flavonoides totais
	(mg EAG/g de extrato seco)	(mg EC/g de extrato seco)
<i>Bulbo de alho picado</i>	5,6 $\pm$ 0,2	3,0 $\pm$ 0,4
<i>Alho picado congelado</i>	6,8 $\pm$ 0,6	6,74 $\pm$ 0,08
<i>Comprimidos à base de alho</i>	1,4 $\pm$ 0,2	0,47 $\pm$ 0,08
<i>Cascas de alho</i>	2,1 $\pm$ 0,1	2,5 $\pm$ 0,2
<i>Condimento de alho picado</i>	3,9 $\pm$ 0,5	5,7 $\pm$ 0,9
<i>Alho cozido</i>	3,8 $\pm$ 0,1	9,6 $\pm$ 0,7

O CFT das diferentes amostras foi determinado com recurso a um método colorimétrico, através da utilização do reagente de Folin-Ciocalteu. Na presença deste reagente, os compostos fenólicos são oxidados formando complexos de cor azul com absorção máxima a um comprimento de onda máximo de 750 nm.

Pela análise da tabela 2, pode ver-se que os valores obtidos variam entre 1,4 e 6,8 mg EAG/g de extrato seco. O CFT foi superior na amostra de alho picado congelado (6,8 mg EAG/g extrato), tendo-se encontrado o teor mais baixo para os comprimidos à base de alho (1,4 mg de EAG/g de extrato). O alho cozido apresentou um valor de CFT de 3,8 mg EAG/g extrato, inferior ao do bulbo de alho picado cru. Estes resultados indicam que os métodos de congelação e de cozimento interferem diretamente no CFT, mas de forma oposta.

Por sua vez, o TFT foi determinado segundo um método colorimétrico que se baseia na complexação dos flavonoides com Al(III) em meio alcalino. Ao adicionar-se  $\text{AlCl}_3$ , este forma um complexo estável flavonoide- $\text{Al}^{3+}$  de coloração rosa, cuja concentração é proporcional à concentração de flavonoides presentes na amostra. Quanto aos resultados obtidos, a amostra de alho cozido foi a que apresentou um resultado superior (9,6 mg EC/g de extrato). Por sua vez, os comprimidos à base de alho foram a amostra que obteve o valor de TFT mais baixo, o que vai de encontro ao resultado apresentado para o CFT.

Bozin *et al.* (2008) quantificaram o CFT e o TFT do bulbo do alho recorrendo a um processo de extração por maceração durante 76 h, à temperatura ambiente, com uma solução metanólica a 80%. O extrato foi filtrado e evaporado à secura, tendo-se posteriormente dissolvido em água para a determinação do conteúdo em fenólicos e flavonoides totais, recorrendo aos métodos de quantificação usados neste trabalho experimental, com pequenas alterações. Obtiveram 0,18 mg EAG/g de extrato para o conteúdo em fenólicos totais e 5,78  $\mu\text{g}$  de EQ (equivalentes de quercetina)/g de extrato para o teor em flavonoides totais. Os resultados obtidos por estes autores foram muito inferiores aos obtidos neste trabalho experimental, contudo há fatores que podem ser relevantes para esta diferença de resultados, destacando-se: (i) as condições edafoclimáticas, uma vez que o alho usado por Bozin *et al.* tem origem na Sérvia; (ii) o método usado para a extração, que difere no solvente, no tempo e na temperatura usados.

Ali *et al.* (2015) estudaram o efeito do cozimento (fervura) no CFT de vários vegetais. Após o processo de cozimento, o CFT dos extratos de oito (incluindo o alho) dos onze vegetais estudados, foi significativamente reduzido, o que vai de encontro aos resultados obtidos neste estudo. De acordo com Sultana (*cit. in* Ali *et al.* 2015), as razões que podem explicar este decréscimo têm a ver com o fenómeno de lixiviação ocorrido durante o processo de fervura, com a formação de complexos proteína-fenol e com a exposição dos ácidos fenólicos à água nas camadas mais externas.

Um outro estudo realizado por Park *et al.* (2009) comparou os conteúdos fenólicos totais dos extratos metanólicos de alho cru (liofilizado, após vaporização, para evitar a oxidação, e depois triturado) e de alho aquecido (alho em pó liofilizado sujeito a aquecimento por corrente de ar). O alho aquecido mostrou uma diminuição significativa do CFT (0,751 mg EAG/g extrato) em relação ao extrato de alho fresco (1,734 mg/ EAG/g extrato). Segundo os autores, esta redução, que ocorre normalmente durante o aquecimento, é provocada principalmente pela ação de enzimas oxidativas, como polifenoloxidasas e peroxidases.

Num outro estudo realizado por Bhatt e Patel (2013), os valores de CFT de alho fresco e cozinhado, extraídos com uma solução ácida (pH 2,0) de metanol a 80% foram de 0,68 e 0,35 mg EAG/g de extrato, respetivamente. Embora o solvente extrator e as condições edafo-climáticas do alho sejam diferentes dos deste estudo, verifica-se também uma diminuição considerável do teor em fenólicos totais quando o alho é cozinhado, à semelhança do que aconteceu nos resultados desta dissertação (de 5,6 para 3,8 mg EAG/g de extrato).

Kallel *et al.* (2014) realizaram um estudo com o objetivo de determinar os conteúdos em fenólicos e flavonoides totais das cascas de alho, recorrendo a vários solventes / misturas de solventes de extração diferentes. Para a amostra extraída com uma mistura etanol:água (50/50), o conteúdo fenólico determinado foi cerca de 13 mg EAG/g casca de alho seca, enquanto o teor de flavonoides totais se situou em 0,507 mg EQ/g casca de alho seca. Comparando estes valores com os obtidos neste estudo, pode-se concluir que o CFT publicado por Kallel *et al.* é cerca de seis vezes superior, enquanto que o TFT destes autores se revelou cerca de um quinto. Nuutila e colaboradores (2003) obtiveram valores de fenólicos totais significativamente mais elevados para o extrato

metanólico das cascas do que para o do bulbo fresco, o que está em desacordo com os resultados deste estudo.

Num estudo realizado por Li *et al.* (2015), as amostras de alho híbrido de Laiwu começaram por ser sujeitas a um pré-tratamento por congelação a  $-18^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente foram incubadas a  $45^{\circ}\text{C}$  durante 4 dias, seguindo-se um processo de aquecimento abaixo de  $70^{\circ}\text{C}$  por vários dias. O CFT foi determinado de dois em dois dias, atingindo o valor máximo de concentração de cerca de 24 mg EAG/g extrato alho seco ao 22º dia, 1,6 vezes maior que o controlo após o mesmo período de tempo e 7,6 vezes superior ao do alho à temperatura ambiente no início do processo (cerca de 3,2 mg EAG/g extrato alho seco). Este estudo permitiu concluir que a congelação como pré-tratamento pode originar a formação de materiais funcionais.

Park *et al.* (2015) estudaram a atividade dos extratos de alho congelados a diferentes temperaturas ( $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $-80^{\circ}\text{C}$  e  $-196^{\circ}\text{C}$ ), a fim de determinar a temperatura de congelamento ideal para manter a atividade fisiológica do alho. Um extrato de alho mantido a  $4^{\circ}\text{C}$  foi utilizado como controlo, sendo o seu conteúdo fenólico  $6,91 \pm 0,69 \mu\text{g}$  EAG/g de extrato, e o seu teor de flavonoides  $0,315 \pm 0,017 \mu\text{g}$  EQ/g de extrato. Embora o conteúdo fenólico não tenha sido afetado pelas diferentes temperaturas de congelamento, o teor em flavonoides do extrato congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  sofreu uma ligeira redução.

## **Determinação da atividade antioxidante:**

### **Método do radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH<sup>•</sup>):**

O método DPPH<sup>•</sup> tem por base a transferência de eletrões onde o DPPH<sup>•</sup>, que possui cor púrpura, é reduzido formando difenil-picril-hidrazina de coloração amarela, por ação de um antioxidante ou de uma espécie radicalar sintética. Consequentemente ocorre um desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorizada pelo decréscimo da absorvência (Kedare e Singh, 2011).

De acordo com os valores apresentados na tabela 3, verificou-se que o extrato de alho cozido foi o que evidenciou uma atividade antioxidante superior, com um IC<sub>50</sub> de 23,4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , seguindo-se as amostras de bulbo de alho picado, casca, comprimidos e alho

Atividade antioxidante do alho (*Allium sativum* L.) quando submetido a diferentes processos tecnológicos

picado congelado, sendo o extrato de condimento de alho picado o que mostrou menor atividade.

**Tabela 3.** Atividade antioxidante determinada pelo método DPPH\* para as diferentes amostras de alho (*Allium sativum*) e derivados estudadas. IC<sub>50</sub>=concentração inibitória, *in vitro*, que diminui em 50% a quantidade do radical. Média ± Desvio Padrão (n=3).

<u>Amostras</u>	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
<i>Bulbo de alho picado</i>	30,4 ± 0,9
<i>Alho picado congelado</i>	51 ± 1
<i>Comprimidos à base de alho</i>	47,7 ± 0,5
<i>Cascas de alho</i>	46 ± 2
<i>Condimento de alho picado</i>	56 ± 2
<i>Alho cozido</i>	23,4 ± 0,8

Os valores de IC<sub>50</sub>, que representam a concentração inibitória, *in vitro*, que diminui em 50% a quantidade do radical, foram obtidos a partir do gráfico traçado da atividade de eliminação do radical DPPH\* contra diferentes concentrações de extrato. Uma maior atividade de eliminação deste radical está associado a um IC<sub>50</sub> mais baixo.

Ichikawa *et al.* (2003) concluíram que o extrato das cascas de alho possui uma forte atividade de eliminação do radical DPPH\*. Uma concentração do extrato de cascas de alho a 0,1%, eliminou aproximadamente 90% dos radicais DPPH\*. Também Ifesan *et al.* (2014) investigaram a capacidade antioxidante do extrato das cascas de alho, tendo obtido um valor de IC<sub>50</sub> de 79,07 µg/mL em comparação com a vitamina C, que apresentou um valor de 4,09 µg/mL.

Park *et al.* (2009) mostraram que os extratos metanólicos de alho cru (liofilizado, após vaporização, para evitar a oxidação, e depois triturado) evidenciavam menor capacidade antioxidante do que os de alho aquecido (alho em pó liofilizado sujeito a

aquecimento por corrente de ar), o que está de acordo com os resultados da tabela 3. Segundo um estudo realizado por Ali *et al.* (2015), a atividade antioxidante do alho cozido, determinada pelo método do radical DPPH<sup>•</sup>, foi inferior à do alho cru, o que contraria os resultados deste estudo. Contudo, dos onze vegetais que Ali *et al.* estudaram, sete obtiveram maior atividade antioxidante após o processo de cozimento, o que pode ser explicado pela quebra da parede celular devido ao aquecimento, provocando a libertação de antioxidantes, a formação de antioxidantes novos e/ou mais fortes ou a inibição de enzimas oxidantes.

Gorinstein *et al.* (2005) também compararam a atividade antioxidante do alho fresco e cozido recorrendo ao método do radical DPPH<sup>•</sup>, tendo o extrato de alho fresco obtido um valor ligeiramente inferior ao de alho cozido. Estes autores concluíram que amostras de alho aquecidas a 100°C, durante 20 minutos, preservam os seus compostos bioativos e a sua atividade antioxidante.

Nguyen (2016) comparou a atividade antioxidante, pelo método do DPPH<sup>•</sup>, de amostras de alho sujeitas a diferentes pré-tratamentos. Os resultados mostraram que a atividade antioxidante do alho sujeito a branqueamento a vapor por 6 minutos ou congelado por 36 horas ou à combinação de branqueamento por 8 minutos e congelamento por 36 horas é maior relativamente à do alho sujeito a outros pré-tratamentos. O alho congelado durante 36 horas evidenciou a maior capacidade antioxidante, comparativamente aos outros métodos e ao controlo, que está em desacordo com os resultados da tabela anterior.

De acordo com Locatelli *et al.* (2017), a atividade antioxidante do alho determinada pelo método do radical DPPH<sup>•</sup> é maior para o alho fresco e menor para o alho frito, tendo o alho cozido obtido valores intermédios. Num outro estudo realizado por Bhatt e Patel (2013), os extratos metanólicos de alho fresco evidenciaram uma maior atividade antioxidante comparativamente aos do alho cozido, que demonstraram possuir uma menor atividade. Resultados semelhantes foram relatados por Locatelli *et al.* (2017). Estes resultados contrariam os obtidos neste estudo, embora algumas variáveis possam ter influenciado, tais como as condições edafo-climáticas e o congelamento prévio das amostras em azoto líquido.

Outro artigo de Park *et al.* (2015) refere a determinação da atividade antioxidante de extratos de alho congelados a diferentes temperaturas (-20°C, -80°C e -196°C). A capacidade de sequestração do radical DPPH• dos extratos de alho a -80°C foi de 61%, enquanto a dos extratos congelados a -20°C e a -196°C se situou nos 51%. Estes resultados sugerem que o congelamento a -80°C parece ser mais adequado que o método convencional (-20°C) no que diz respeito à perda de atividade fisiológica do alho.

#### **Avaliação do poder antioxidante por redução do ião férrico (FRAP):**

O ensaio FRAP é um ensaio indireto, caracterizado pela redução do complexo férrico (Fe<sup>3+</sup>) ao estado ferroso (Fe<sup>2+</sup>), obtida pela ação de um composto antioxidante, em meio ácido, por forma a manter a solubilidade do ferro. Ocorre a formação do complexo ferroso de cor azul intensa por redução do complexo férrico (Kesić *et al.*, 2015).

**Tabela 4.** Avaliação do poder antioxidante por redução do ião férrico (FRAP) das diferentes amostras de alho (*Allium sativum*) e derivados estudadas. IC<sub>50</sub>=concentração inibitória, *in vitro*, que diminui em 50% a quantidade do radical. Média ± Desvio Padrão (n=3).

<i>Amostras</i>	<b>FRAP</b>
	<b>IC<sub>50</sub> (µM/g de amostra seca)</b>
<i>Bulbo de alho picado</i>	5,8 ± 0,3
<i>Alho picado congelado</i>	11 ± 1
<i>Comprimidos à base de alho</i>	9,1 ± 0,9
<i>Cascas de alho</i>	7,2 ± 0,7
<i>Condimento de alho picado</i>	15 ± 1
<i>Alho cozido</i>	2,2 ± 0,3

À semelhança do que se verificou para o método do radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo, conclui-se que o extrato de alho cozido foi o que evidenciou uma atividade antioxidante superior, seguindo-se os extratos de bulbo de alho picado, casca, comprimidos, alho picado congelado e, por último, condimento de alho picado, que evidenciou menor atividade.

Um estudo realizado por Locatelli et al. (2017), já referido no contexto do método do DPPH\*, evidenciou uma maior atividade antioxidante determinada por redução do íão férrico (FRAP) para o alho fresco relativamente ao cozido. No entanto, este estudo prova que o alho cozido por processos doméstico mantém a sua atividade antioxidante.

Bhatt e Patel (2013), na sequência do seu estudo, obtiveram para os extratos metanólicos de alho fresco uma atividade antioxidante maior do que a do alho cozido, tal como referido anteriormente para o método do radical DPPH\*, embora os valores obtidos estejam dentro da mesma ordem de grandeza.

A capacidade antioxidante, determinada pelos métodos de FRAP e do radical DPPH\*, revelou-se superior para o alho fresco ou sujeito a um processo de cozimento rápido. Os autores deste estudo concluíram que se o alho for cozinhado durante um curto período de tempo, preserva um alta bioatividade (Jastrzebski et al., 2007).

Volden et al. avaliaram (2009) o efeito do congelamento na atividade antioxidante da couve-flor, pelo método FRAP, e concluíram haver uma ligeira diminuição da mesma ao fim de 3 meses de armazenamento, que se tornou mais significativa ao fim de 1 ano. El-Hadidy *et al.* (2014) chegaram a um resultado semelhante quando estudaram o efeito do congelamento em cebolas, justificando a diminuição da atividade antioxidante pela inibição do poder catalítico das hidrolases.

### **Capacidade de captação de espécies reativas:**

O organismo possui sistemas naturais de eliminação de radicais livres, enzimáticos ou não. Estes originam a eliminação dos radicais livres ou a interrupção da sua transformação em produtos mais tóxicos para as células. O efeito prejudicial dos radicais livres ocorre quando estes estão em quantidades excessivas no organismo, ultrapassando a capacidade do mesmo em neutralizá-los com os seus sistemas naturais.

Esses sistemas de defesa combatem, no organismo, diversos radicais livres, tais como, o radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ), e o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) (Barbosa *et al.*, 2010).

#### **- Determinação da capacidade de captação do $O_2^{\cdot-}$ :**

Pensa-se que o  $O_2^{\cdot-}$  é o radical que inicia o stresse oxidativo, uma vez que é facilmente produzido por múltiplos processos in vivo e leva à geração de muitos outros oxidantes. Este radical é transformado em  $H_2O_2$  pela enzima superóxido dismutase e, ao reagir com metais redox ativos, gera  $HO^{\cdot}$  pela reação de Fenton. Por sua vez, o  $H_2O_2$  pode reagir com o  $Cl^-$  através da enzima mieloperoxidase e formar  $HOCl$  nos neutrófilos. Por fim, o  $O_2^{\cdot-}$  pode reagir com o  $NO^{\cdot}$ , dando origem a uma espécie altamente oxidante, o  $ONOO^-$  (Ribeiro *et al.*, 2015).

A capacidade de captação deste radical pelos extratos alvo de estudo apresentaram  $IC_{50}$  superiores ao da quercetina ( $0,72 \pm 0,02 \mu g/ ml$ ), controlo positivo usado neste estudo. O extrato de alho picado congelado foi o que apresentou maior capacidade de captação de  $O_2^{\cdot-}$  ( $39 \mu g/ ml$ ), não tendo os extratos de casca de alho, comprimidos à base de alho e condimento de alho em pó evidenciado qualquer atividade, como se pode observar na tabela 5. Para todos os extratos que mostraram atividade, verificou-se uma correlação positiva entre o conteúdo em fenólicos totais e a capacidade de inibição do radical superóxido.

Pedraza-Chaverrí *et al.* (2006) determinaram a capacidade de captação do radical  $O_2^{\cdot-}$  e verificaram que o extrato de alho cozido possui uma menor capacidade de captação deste radical relativamente à do extrato de alho fresco. O mesmo estudo mostrou também que o extrato de alho em pó tem uma menor capacidade de captação do radical superóxido do que o alho fresco. Estes resultados estão de acordo com os obtidos neste estudo, como se pode verificar pela análise da tabela 5.

**Tabela 5.** Capacidade de captação pelos diferentes extratos do radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), do peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) e do radical óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ).  $IC_{50}$  = concentração inibitória, *in vitro*, que diminui em 50% a quantidade de espécies reativas na média testada. Média  $\pm$  Desvio Padrão (n=3).

<i>Amostras</i>	% inibição da espécie reativa $IC_{50}$ ( $\mu g/mL$ ) n = 3		
	$O_2^{\cdot-}$	$H_2O_2$	$NO^{\cdot}$
<i>Bulbo de alho picado</i>	50 $\pm$ 2	80 $\pm$ 2	26 $\pm$ 1
<i>Alho picado congelado</i>	39 $\pm$ 3	58 $\pm$ 1	22 $\pm$ 1
<i>Comprimidos à base de alho</i>	Sem atividade	88 $\pm$ 6	63 $\pm$ 2
<i>Cascas de alho</i>	Sem atividade	95 $\pm$ 3	48,3 $\pm$ 0,9
<i>Condimento de alho picado</i>	Sem atividade	87 $\pm$ 2	31,1 $\pm$ 0,6
<i>Alho cozido</i>	74 $\pm$ 5	86 $\pm$ 2	32 $\pm$ 1
<b><i>Controlos positivos</i></b>			
<i>Quercetina</i>	29 $\pm$ 2	-	0,72 $\pm$ 0,025
<i>Ácido ascórbico</i>	-	96 $\pm$ 3	

#### **- Determinação da capacidade de captação do $H_2O_2$ :**

O  $H_2O_2$  é um metabolito do oxigénio extremamente reativo, que detém a capacidade de atravessar membranas biológicas e oxidar compostos celulares (Bozin *et al.*, 2008). A sua reatividade advém da participação como intermediário na reação que produz o radical hidroxilo (Andrade *et al.*, 2010). Alguns processos, tais como, a proliferação, diferenciação e reparação de tecidos, utilizam este metabolito de oxigénio de baixo peso molecular como composto de sinalização (Sies, 2014).

De acordo com os resultados apresentados na tabela 5, o extrato de alho picado congelado foi o que apresentou a maior capacidade de captação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (58 µg/mL), enquanto que o extrato de cascas de alho (95 µg/mL) foi o que obteve a menor capacidade. Quanto aos controlos positivos, todos os extratos estudados apresentaram valores inferiores aos do ácido ascórbico (96 µg/mL). De uma forma geral, com a exceção dos comprimidos à base de alho, há uma relação entre a capacidade de inibição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e o conteúdo em fenólicos totais, pois quanto maior o CFT, maior a capacidade de inibição do peróxido de hidrogénio.

Benkeblia (2005) estudou a capacidade de captação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de cebola e alho, tendo este último apresentado uma alta capacidade de captação deste radical (91%).

Um dos parâmetros avaliados num estudo realizado por Bozin *et al.* (2008) foi a capacidade de captação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, em que para o extrato de alho fresco extraído através de um método de maceração com 80% de metanol obtiveram um valor de IC<sub>50</sub> de 2,01 mg/mL.

Num estudo realizado por Pedraza-Chaverrí *et al.* (2006), a amostra de alho fresco demonstrou possuir uma maior capacidade de captação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do que as amostras de alho cozido. Estes resultados estão de acordo com os obtidos neste estudo, uma vez que, para o extrato de alho fresco, se obteve um valor de IC<sub>50</sub> de 80 µg/mL, sendo que para o extrato de alho cozido o valor de IC<sub>50</sub> obtido foi de 86 µg/mL.

#### **- Determinação da capacidade de captação do NO•:**

O NO• é uma molécula de sinalização com um importante papel. Possui funções essenciais no sistema cardiovascular e neural, na resposta inflamatória, e ainda um papel protetor ao nível do fígado ao inibir a ocorrência de trombose e apoptose. Devido ao seu eletrão não emparelhado, o NO• é um radical livre sem carga (Modun *et al.*, 2014). Contudo, este radical tem sido associado a papéis bastante críticos em numerosos processos fisiológicos, como no dano do ADN nuclear e mitocondrial, e também na fisiopatologia de muitas doenças, tais como, doença pulmonar aguda, aterosclerose e choque séptico (Eiserich *et al.*, 1998, D'Ambrosio *et al.*, 2001). A sua toxicidade não está

apenas relacionada com os níveis de geração de NO<sup>•</sup>, mas também das espécies que com ele reagem, tornando-o um oxidante tóxico.

O extrato de alho picado congelado (22 µg/mL) foi o que evidenciou maior capacidade de inibição do radical NO<sup>•</sup>, enquanto o extrato de comprimidos à base de alho (63 µg/mL) mostrou ter a menor capacidade de todas as amostras estudadas, embora todos os extratos apresentem valores de IC<sub>50</sub> muito superiores aos da quercetina. Verificou-se, para todos os extratos estudados, que quanto maior o conteúdo em fenólicos totais, maior a capacidade de inibição do NO<sup>•</sup>.

Num estudo realizado por Gorinstein *et al.* (2005), observou-se a ocorrência de uma ligeira diminuição da capacidade de captação do óxido nítrico do alho cozido em relação à do alho fresco. Estes resultados vão de encontro aos obtidos neste estudo, uma vez que se obteve um maior valor de IC<sub>50</sub> para o alho cozido (32 µg/mL) em relação ao alho fresco (26 µg/mL), o que se traduz numa menor capacidade de captação do NO<sup>•</sup> para o alho cozido.

## CAPÍTULO VI.

### 6.1. Conclusão

O ser humano recorreu desde sempre ao uso de plantas. Inicialmente a utilização destas foi devida ao seu aporte nutricional, mas foi desde a descoberta das suas propriedades medicinais que a flora natural se tornou útil para o tratamento de doenças e para uma melhoria da saúde das comunidades.

O alho apresenta um amplo benefício para a saúde, havendo evidências acerca da sua eficácia terapêutica na prevenção das mais diversas patologias, como é o caso das doenças cardiovasculares, da diabetes e das doenças ateroscleróticas. Estas propriedades benéficas do alho advêm da sua composição heterogénea, da qual fazem parte compostos fenólicos e flavonoides.

Os fenólicos, um grupo bem conhecido de metabólicos secundários de plantas, são sequestradores de radicais livres. De uma forma geral, verificou-se que quanto maior foi o conteúdo em fenólicos totais obtido para os diferentes extratos, maior a capacidade destes últimos para inibir as espécies reativas  $\text{NO}^*$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Posto isto, apesar de todos os extratos apresentarem valores consideráveis de compostos fenólicos e flavonoides, o extrato de alho congelado pode ser considerado o mais promissor, tendo apresentado uma maior quantidade dos mesmos. Verificou-se então para este extrato uma maior capacidade de captação das espécies referidas.

Quanto à atividade antioxidante, o extrato de alho cozido apresentou maior atividade, tanto pela metodologia do radical DPPH $^*$ , como pelo método FRAP. Como tal, deverá ser preferencialmente consumido alho cozido comparativamente ao alho fresco, dada a sua maior capacidade antioxidante evidenciada pelos dois métodos referidos.

Relativamente às cascas de alho, concluiu-se que estas são uma fonte promissora de compostos antioxidantes naturais de fácil acesso. Consequentemente, esta parte do alho, habitualmente não edível, poderá ser aproveitada para diferentes aplicações, tanto a nível alimentar, como biológico. Por outro lado, os suplementos de alho apresentam uma menor atividade antioxidante, comparativamente ao alho fresco.

## VII. Referências bibliográficas

- Agarwal, K. C. (1996). Therapeutic actions of garlic constituents. *Medicinal Research Reviews*, 16 (1), pp. 111-124.
- Ali, M., Mahsa, M., Mehrzad, B. (2015). Effect of boiling cooking on antioxidant activities and phenolic content of selected iranian vegetables. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 6 (3), pp. 636-641.
- Andrade, E. R., Melo-Sterza, F. A., Seneda, M. M., Alfieri, A. A. (2015). Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 34 (2), pp. 79-85.
- Asdaq, S. M. e Inamdar, M. N. (2009). Pharmacodynamic interaction of garlic with hydrochlorothiazide in rats. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*, 53 (2), pp. 127-136.
- Banerjee, S. K. e Maulik, S. K. (2002). Effect of garlic on cardiovascular disorders: a review. *Nutrition Journal*, 1, pp. 1-14.
- Banerjee, S. K., Mukherjee, P. K., Maulik, S. K. (2003). Garlic as an antioxidant: the good , the bad and the ugly. *Phytotherapy Research*, 17 (2), pp. 97–106.
- Barbosa, K. B. F., Costa, N. M. B., Alfenas, R. C. G., Paula, S. O., Minim, V. P. R., Bressan, J. (2010). Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. *Revista de Nutrição*, 23 (4), pp. 629-643.
- Beleza e Saúde. Benefícios do alho [Em linha]. Disponível em <<https://belezaesaude.com/alho>> . [Consultado em 5/11/2017].
- Benkeblia, N. (2005). Free-radical scavenging capacity and antioxidant properties of some selected onions (*Allium cepa* L.) and garlic (*Allium sativum* L.) extracts. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48 (5), pp. 753–759.
- Beretta, H. V., Bannoud, F., Insani, M., Berli, F., Hirschegger, P., Galmarini, C., R., Cavagnaro, P. F. (2017). Relationships between bioactive compound content and the

Atividade antioxidante do alho (*Allium sativum* L.) quando submetido a diferentes processos tecnológicos

antiplatelet and antioxidant activities of six *allium* vegetable species. *Food Technology and Biotechnology*, 55 (2), pp. 266-275.

Berginc, K., Milisav, I., Kristl, A. (2010). Garlic flavonoids and organosulfur compounds: impact on the hepatic pharmacokinetics of saquinavir and darunavir. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 25 (6), pp. 521-530.

Bhagyalakshmi, N., Thimmaraju, R., Venkatachalam, L., Murthy, K. N. C., Sreedhar, R. V. (2005). Nutraceutical applications of garlic and the intervention of biotechnology. *Food Science and Nutrition*, 45, pp. 607-621.

Bhatt, A. e Patel, V. (2013). Antioxidant activity of garlic using conventional extraction and *in vitro* gastrointestinal digestion. *Free Radicals and Antioxidants*, 3 (1), pp. 30–34.

Biesalski, H. K., Dragsted, L. O., Elmadfa, I., Grossklaus, R., Müller, M., Schrenk, D., Walter, P., Weber, P. (2009). Bioactive compounds: definition and assessment of activity. *Nutrition*, 25 (11-12), pp. 1202-1205.

Bilal, M., Rauf, A., Rasheed, F., Butt, Q. S., Hussain, A., Mehboob, Z., Mehboob, M. S. (2016). *In vitro* antimicrobial activity of garlic (*Allium sativum*) against clinical isolates of vibrio cholerae. *Journal of Rawalpindi Medical College*, 20 (4), pp. 312-316.

Block, E. (1985). The chemistry of garlic anexo onions. *Scientific American*, 252 (3), pp. 114-121.

Borlinghaus, J., Albrecht, F., Gruhlke, M. C. H., Nwachukwu, I. D., Slusarenko, A. J. (2014). Allicin: chemistry and biological properties. *Molecules*, 19 (8), pp. 12591-12618.

Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I., Goran, A., Igetic, R. (2008). Phenolics as antioxidant in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae). *Food Chemistry*, 111 (4), pp. 925-929.

Bradley, J. M., Organ, C. L., Lefer, D. J. (2016). Garlic-derived organic polysulfides and myocardial protection. *The Journal of Nutrition*, 146 (2), pp. 403S-409S.

Cardelle-Cobas, A., Costo, R., Corzo, N., Villamiel, M. (2009). Fructo-oligosaccharide changes during the storage of dehydrated commercial garlic and onion samples. *International Journal of Food Science and Technology*, 44 (5), pp. 947–952.

Cavagnaro, P. F., Camargo, A., Galmarini, C. R., Simon, P. W. (2007). Effect of cooking on garlic (*Allium sativum* L.) antiplatelet activity and thiosulfinates content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (4), pp. 1280-1288.

Cavallito, C. J., Bailey, J. H. (1944). Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum* – I. Isolation, physical properties and antibacterial action. *Journal of the American Chemical Society*, 66 (11), pp. 1950-1951.

Chhouk, K., Uemori, C., Wahyudiono, Kanda, H., Goto, M. (2017). Extraction of phenolic compounds and antioxidant activity from garlic husk using carbon dioxide expanded ethanol. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 117, pp. 113-119.

Chisté, R. C., Mercadante, A. Z., Gomes, A., Fernandes, E., Lima, J. L., Bragagnolo, N. (2011). *In vitro* scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen species. *Food Chemistry*, 127 (2), pp. 419-426.

Cicero, A. F. G., Fogacci, F., Rosticci, M., Parini, A., Giovannini, M., Veronesi, M. D'Addato, S., Borghi, C. (2017). Effect of a short-term dietary supplementation with phytosterols, red yeast rice or both on lipid pattern in moderately hypercholesterolemic subjects: a three-arm, double-blind, randomized clinical trial. *Nutrition & Metabolism*, 14 (61), pp. 1-7.

Cortés, A., García-Ferrús, M., Sotillo, J., Esteban, J. G., Toledo, R., Muñoz-Antolí, C. (2017). Effects of dietary intake of garlic on intestinal trematodes. *Parasitology Research*, 116 (8), pp. 2119-2129.

Corzo-Martínez, M., Corzo, N., Villamiel, M. (2007). Biological properties of onions and garlic. *Trends in Food Science & Technology*, 18 (12), pp. 609-625.

Costa, A. S. G., Alves, R. C., Vinha, A. F., Barreira, S. V. P., Nunes, M. A., Cunha, L. M., Oliveira, M. B. P. P. (2014). Optimization of antioxidants extraction from coffee

Atividade antioxidante do alho (*Allium sativum* L.) quando submetido a diferentes processos tecnológicos

silverskin, a roasting by-product, having in view a sustainable process. *Industrial Crops and Products*, 53, pp. 350-357.

D'Ambrosio, S. M., Gibson-D'Ambrosio, R. E., Brady, T., Oberyszyn, A. S., Robertson, F. M. (2001). Mechanisms of nitric oxide-induced cytotoxicity in normal human hepatocytes. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 37 (1), pp. 46-54.

Del Rio, D., Costa, L. G., Lean, M. E. J., Crozier, A. (2010). Polyphenols and health: what compounds are involved. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 20 (1), pp. 1-6.

Devasagayam, T. P., Tilak, J. C., Boloor, K. K., Sane, K. S., Ghaskadbi, S. S., Lele, R. D. (2004). Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *Journal of the Association of Physicians of India*, 52, pp. 794-804.

Dogan, O., Cubucku, H. C., Durak, Z. E., Kocaoglu, H., Durak, I. (2017). Effects of garlic extract on adenosine deaminase, 5' nucleotidase, and xanthine oxidase enzymes in cancerous gastric tissues. *Biomedical Research*, 28 (13), pp. 6080-6084.

Durak, I., Oztürk, H. S., Olcay, E., Güven, C. (2002). Effects of garlic extract supplementation on blood lipid and antioxidant parameters and atherosclerotic plaque formation process in cholesterol-fed rabbits. *Journal of Herbal Pharmacotherapy*, 2 (2), pp. 19-32.

Eiserich, J. P., Patel, R. P., O'Donnell, V. B. (1998). Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules. *Molecular Aspects of Medicine*, 19 (4-5), pp. 221-357.

El-Hadidy, E. M., Mossa, M. E. A., Habashy, H. N. (2014). Effect of freezing on the pungency and antioxidants activity in leaves and bulbs of green onion in Giza 6 and Photon varieties. *Annals of Agricultural Sciences*, 59 (1), pp. 33-39.

Estêvão, B. (2017). Alho – Cânfora dos pobres. [Em linha]. Disponível em <<https://www.agroportal.pt/canfora-dos-pobres-bruno-estevao/>>. [Consultado em 12/11/17].

Fратиани, F., Ombra, M. N., Cozzolino, A., Riccardi, R., Spigno, P., Tremonte, P., Coppola, R., Nazarro, F. (2016). Phenolic constituents, antioxidant, antimicrobial and anti-proliferative activities of different endemic Italian varieties of garlic (*Allium sativum* L.). *Journal of Functional Food*, 21, pp. 240-248.

Gamboa-Santos, J., Soria, A. C., Corzo-Martínez, M., Villamiel, M., Montilla, A. (2012). Effect of storage on quality of industrially dehydrated onion, garlic, potato and carrot. *Journal of Food and Nutrition Research*, 51 (3), pp. 132-144.

García-Díez, J., Alheiro, J., Pinto, A. L., Soares, L., Falco, V., Fraqueza, M. J. Patarata, L. (2017). Influence of food characteristics and food additives on the antimicrobial effect of garlic and oregano essential oils. *Foods*, 6 (44), pp. 1-10.

Gorinstein, S., Drzewiecki, J., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Najman, K., Jastrzebski, Z., Zachwieja, Z., Barton, H., Shtabsky, B., Katrich, E., Trakhtenberg, S. (2005). Comparison of the bioactive compounds and antioxidant potentials of fresh and cooked polish, ukrainian, and israeli garlic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (7), pp. 2726-2732.

Gorinstein, S., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Namiesnik, J., Najman, K., Drzewiecki, J., Cvikrová, M., Martincová, O., Katrich, E., Trakhtenberg, S. (2008). Comparison of the main bioactive compounds and antioxidant activities in garlic and white and red onions after treatment protocols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (12), pp. 4418-4426.

Grünwald, J. e Jänicke, C. (2009). *A Farmácia Verde*, Everest.

Harris, J. C., Cottrell, S. L., Plummer, S., Lloyd, D. (2001). Antimicrobial properties of *Allium sativum* (garlic). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57 (3), pp. 282-286.

Hile, A. G., Shan, Z., Block, E. (2004). Aversion of European starlings (*Sturnus vulgaris*) to garlic oil as an avian repellent. Garlic oil analysis by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, pp. 2192-2196.

Huang, C. H., Hsu, F. Y., Wu, Y. H., Zhong, L., Tseng, M. Y., Kuo, C. J., Hsu, A. L., Liang, S. S. Chiou, S. H. (2015). Analysis of lifespan-promoting effect of garlic extract

Atividade antioxidante do alho (*Allium sativum* L.) quando submetido a diferentes processos tecnológicos

by na integrated metabolo-proteomics approach. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 26 (8), pp. 808-817.

Ichikawa, M., Ryu, K., Yoshida, J., Ide, N., Kodera, Y., Sasaoka, T., Rosen, R. T. (2003). Identification of six phenylpropanoids from garlic skin as major antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (25), pp. 7313-7317.

Ifesan, B. O. T., Fadipe, E. A., Ifesan, B. T. (2014). Investigation of antioxidant and antimicrobial properties of garlic peel extract (*Allium sativum*) and its use as natural food additive in cooked beef. *Journal of Scientific Research & Reports*, 3 (5), pp. 711–721.

Jastrzebski, Z., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Namiesnik, J., Zachwieja, Z., Barton, H., Pawelzik, E., Arancibia-Avila, P., Toledo, F., Gorinstein, S. (2007). The bioactivity of processed garlic (*Allium sativum* L.) as shown *in vitro* and *in vivo* studies on rats. *Food and Chemical Toxicology*, 45 (9), pp. 1626-1633.

Jiménez-Monreal, A. M., García-Diz, L., Martínez-Tomé, M., Mariscal, M., Murcia, M. A. (2009). Influence of cooking methods on antioxidant activity of vegetables. *Journal of Food Science*, 74 (3), pp. H97-H103.

Johnson, M., Olaleye, O. N., Kolawole, O. S. (2016). Antimicrobial and antioxidant properties of aqueous garlic (*Allium sativum*) extract against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *British Microbiology Research Journal*, 14 (1), pp. 1-11.

Kallel, F., Driss, D., Chaari, F., Belghith, L., Bouaziz, F., Ghorbel, R., Chaabouni, S. E. (2014). 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*, 62, pp. 34–41.

Kedare, S. B. e Singh, R? P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, 48 (4) , pp. 412-422.

Kesić, A., Ibrišimović-Mehmedinović, N., Šestan, A. (2015). Phytochemical profile of honey. In: Rao, A. V., Rao, L. G. (Ed.). *Phytochemicals - Isolation, Characterisation and Role in Human Health*: InTech, pp. 99-109.

Atividade antioxidante do alho (*Allium sativum* L.) quando submetido a diferentes processos tecnológicos

Kim, S., Kim, D. B., Jin, W., Park, J., Yoon, W., Lee, Y., Kim, S., Lee, S., Kim, S., Lee, O. H., Shin, D., Yoo, M. (2017). Comparative studies of bioactive organosulphur compounds and antioxidant activities in garlic (*Allium sativum* L.), elephant garlic (*Allium ampeloprasum* L.) and onion (*Allium cepa* L.). *Natural Product Research*, 5 (1-5).

Kodali, R. T. e Eslick, G. D. (2015). Meta-analysis: Does garlic intake reduce risk of gastric cancer? *Nutrition and Cancer*, 67 (1), pp. 1-11.

Kumar, R., Chaatwal, S., Arora, S., Sharma, S., Singh, J., Singh, N., Bhandari, V., Khurana, A. (2013). Antihyperglycemic, antihyperlipidemic, anti-inflammatory and adenosine deaminase – lowering effects of garlic in patients with type 2 diabetes mellitus with obesity. *Diabetes, Metabolic Syndrome, and Obesity*, 6, pp. 49-56.

Kumar, S. e Asdaq, S. M. B. (2017). Impact of garlic on cardioprotective potential of Ramipril on ischemia-reperfusion induced myocardial dysfunction in rats. *International Journal of Complementary & Alternative Medicine*, 5 (3), pp. 1-6.

Lanzotti, V. (2006). The analysis of onion and garlic. *Journal of Chromatography*, 1112 pp. 3-22.

Lanzotti, V., Scala, F., Bonanomi, G. (2014). Compounds from *Allium* species with cytotoxic and antimicrobial activity. *Phytochemistry Reviews*, 13 (4), pp. 769-791.

Leelarungrayub, N., Rattanapanone, V., Chanarat, N., Gebicki, J. M. (2006). Quantitative evaluation of the antioxidant properties of garlic and shallot preparations. *Nutrition*, 22 (3), pp. 266–274.

Lemar, K. M., Turner, M. P., Lloyd, D. (2002). Garlic (*Allium sativum*) as an anti-*Candida* agent: a comparison of the efficacy of fresh garlic and freeze-dried extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 93, pp. 398–405.

Lemar, K. M., Passa, O., Aon, M. A., Cortassa, S., Müller, C. T., Plummer, S., O'Rourke, B., Lloyd, D. (2005). Allyl alcohol and garlic (*Allium sativum*) extract produce oxidative stress in *Candida albicans*. *Microbiology*, 151, pp. 3257–3265.

Lenková, M., Bystrická, J., Tóth, T., Hrstková, M. (2017). Evaluation and comparison of the content of total polyphenols and antioxidant activity of selected species of the genus *Allium*. *Journal of Central European Agriculture*, 17 (4), pp. 1119-1133.

Li, N., Lu, X., Pei, H., Qiao, X. (2015). Effect of freezing pretreatment on the processing time and quality of black garlic. *Journal of Food Process Engineering*, 38 (4), pp. 329-335.

Lisanti, A., Formica, V., Ianni, F., Albertini, B., Marinozzi, M., Sardella, R., Natalie, B. (2015). Antioxidant activity of phenolic extracts from different cultivars of Italian onion (*Allium cepa*) and relative human immune cell proliferative induction. *Pharmaceutical Biology*, 54 (5), pp. 799–806.

Locatelli, D. A., Nazareno, M. A., Fusari, F. M., Camargo, A. B. (2017). Cooked garlic and antioxidant activity: Correlation with organosulfur compound composition. *Food Chemistry*, 220, pp. 219-224.

Madrona, G. e Almeida, A. M. (2008). Elaboração de biscoitos tipo cookie à base de okara e aveia. *Revista Tecnológica*, 17, pp. 61-72.

Mancini, F. V., Paul, D., Gauvreau, J., Volatier, J. L., Vin, K., Hulin, M. (2015). Dietary exposure to benzoates (E210–E213), parabens (E214–E219), nitrites (E249–E250), nitrates (E251–E252), BHA (E320), BHT (E321) and aspartame (E951) in children less than 3 years old in France. *Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 32 (3), pp. 293-306.

Modun, D., Giustarini, D., Tsikas, D. (2014). Nitric oxide-related oxidative stress and redox status in health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 129651.

Mohammadi, A. e Oshaghi, E. A. (2014). Effect of garlic on lipid profile and expression of LXR alpha in intestine and liver of hypercholesterolemic mice. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, 13 (20), pp. 1-6.

Naji, K. M., Al-Shaibani, E. S., Alhadi, F. A., Al-Soudi, S. A., D'souza-M. R. (2017). Hepatoprotective and antioxidant effects of single clove garlic against CCl<sub>4</sub> - induced

hepatic damage in rabbits. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17 (411), pp. 1–12.

Nejad, A. S. M., Shabani, S., Bayat, M., Hosseini, S. E. (2014). Antibacterial effect of garlic aqueous extract on *Staphylococcus aureus* in namburger. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 7 (11), pp. 1-5.

Nuutila, A. M., Puupponen-Pimiä, 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, pp. 485-493.

Nguyen, T. M. (2016). Effect of pretreatments (blanching, freezing, combine of blanching and freezing) on bioactive compounds and free radical scavenging activity of garlic [Em linha]. Disponível em <  
[https://www.researchgate.net/publication/312069725\\_Effect\\_of\\_pretreatments\\_blanching\\_freezing\\_combine\\_of\\_blanching\\_and\\_freezing\\_on\\_bioactive\\_compounds\\_and\\_free\\_radical\\_scavenging\\_activity\\_of\\_garlic](https://www.researchgate.net/publication/312069725_Effect_of_pretreatments_blanching_freezing_combine_of_blanching_and_freezing_on_bioactive_compounds_and_free_radical_scavenging_activity_of_garlic)>. [Consultado em 6/01/18].

Oliveira, A. C., Valentim I. B., Goulart, M. O. F., Silva, C. A., Bechara, E. J. H., Trevisan, M. T. S (2009). Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Quim Nova*, 32 (3), pp. 689-702.

Oommen, S., Anto, R. J., Srinivas, G., Karunagaran, D. (2004). Allicin (from garlic) induces caspase-mediated apoptosis in cancer cells. *European Journal of Pharmacology*, 485 (1-3), pp. 97–103.

Palafox-Carlos, H., Ayala-Zavala, J. F., González-Aguilar, G. A. (2011). The role of dietary fiber in the bioaccessibility and bioavailability of fruit and vegetable antioxidants. *Journal of Food Science*, 76 (1), pp. R6–R15.

Park, J. W., Kim, J., Park, S. H., Choi, D. S., Choi, S. R., Oh, S., Kim, Y. H., Yoo, S. M., Han, G. J. (2015). Effects of freezing temperature on the physiological activities of garlic extracts. *Korean Journal of Food Preservation*, 22 (4), pp. 520-527.

Atividade antioxidante do alho (*Allium sativum* L.) quando submetido a diferentes processos tecnológicos

Park, J., Park, Y. K., Park, E. (2009). Antioxidative and antigenotoxic effects of garlic (*Allium sativum* L.) prepared by different processing methods. *Plant Foods for Human Nutrition*, 64 (4), pp. 244-249.

Pedraza-Chaverri, J., Medina-Campos, O. N., Avila-Lombardo, R., Zúñiga-Bustos, A. B., Orozco-Ibarra, M. (2006). Reactive oxygen species scavenging capacity of different cooked garlic preparations. *Life Sciences*, 78 (7), pp. 761-770.

Piscitelli, S. C., Burstein, A. H., Welden, N., Gallicano, K. D., Falloon, J. (2002). The effect of garlic supplements on the pharmacokinetics of Saquinavir. *Clinical Infectious Diseases*, 34 (2), pp. 234-238.

Queiroz, Y. S., Antunes, P. B., Vicente, S. J. V., Sampaio, J. R., Shibao, J. R., Bastos, D. H. M., Torres, E. A. F. S. (2014). Bioactive compounds *in vitro* antioxidant capacity and Maillard reaction products of raw, boiled and fried garlic (*Allium sativum* L.). *International Journal of Food Science & Technology*, 49 (5), pp. 1308–1314.

Rahman, K. (2003). Garlic and aging: new insights into an old remedy. *Ageing Research Reviews*, 2 (1), pp. 39-56.

Rahman, K. (2007). Review effects of garlic on platelet biochemistry and physiology. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51 (11), pp. 1335–1344.

Ray, B., Chauhan, N. B., Lahiri, D. K. (2011). Oxidative insults to neurons and synapse are prevented by Aged Garlic Extract (AGE) and S-allyl-L-Cysteine (SAC) treatment in the neuronal culture and APP-Tg mouse model. *Journal of Neurochemistry*, 117 (3), pp. 388-402.

Remédio caseiro. Tratamentos utilizando o chá de alho [Em linha]. Disponível em <<https://www.remedio-caseiro.com/tratamentos-utilizando-o-cha-de-alho>>. [Consultado em 5/11/2017].

Ribeiro, T. P., Fernandes, C., Melo, K. V., Ferreira, S. S., Lessa, J. A., Franco, R. W., Schenk, G., Pereira, M. D., Horn, A. (2015). Iron, copper, and manganese complexes with in vitro superoxide dismutase and/or catalase activities that keep *Saccharomyces cerevisiae* cells alive under severe oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*, 80, pp. 67-76.

Rivlin, R. S. (2001). Recent advances on the nutritional effects associated with the use of garlic as a supplement historical perspective on the use of garlic. *The Journal of Nutrition*, 131, pp. 977S–979S.

Rodrigues, F., Palmeira-de-Oliveira, A., Neves, J., Sarmiento, B., Amaral, M. H., Oliveira, M. B. (2013). *Medicago* spp. extracts as promising ingredients for skin care products. *Industrial Crops and Products*, 49, pp. 634-644.

Roy, N., Davis, S., Narayanankutty, A., Nazeem, P. A., Devassay, B., T., Abida, P.S., Raghavamenon, A., Valsala, P. A. (2016). Garlic phytochemicals possess anticancer activity by specifically targeting breast cancer biomarkers - an in silico study. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 17 (6), pp. 2883–2888.

Sahlin, E., Savage, G. P., Lister, C. E. (2004). Investigation of the antioxidant properties of tomatoes after processing. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17 (5), pp. 635-647.

Seki, T. e Hosono, T. (2015). Prevention of cardiovascular diseases by garlic-derived sulfur compounds. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 61, pp. S83-S85.

Shakurfow, F. A. A., Mahmoud, M. B., Gamal, M. A. B. (2015). Assessment of antimicrobial activity of onion (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*) extracts on *Listeria monocytogenes*; in vitro study. *Lebda Medical Journal*, 1, pp. 1-5.

Sies, H. (2014). Role of metabolic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation - Redox signaling and oxidative stress. *The Journal of Biological Chemistry*, 289 (13), pp. 8735-8741.

Silva, N. L., Araújo, I. P. C., Batista, M. R. F., Santos, T. B. A., Fernando, W. L., Amaral, F. R. (2017). Determinação da atividade antioxidante e do teor de flavonoides totais

Atividade antioxidante do alho (*Allium sativum* L.) quando submetido a diferentes processos tecnológicos

equivalentes em quercetina em extrato aquoso de folhas de *Cymbopogon citratus* (d.c.) stapf e *Melissa officinalis* lam obtidos por decocção. *Conexão Ci*, 12 (1), pp. 46–53.

Singh, B. N., Singh, B. R., Singh, R. L., Prakash, D., Sarma, B. K., Singh, H. B. (2009). Antioxidant and anti-quorum sensing activities of green pod of *Acacia nilotica* L.. *Food and Chemical Toxicology*, 47 (4), pp. 778-786.

Sobenin, I. A., Adriananova, I. V., Lakunin, K. Y., Karagodin, V. P., Bobryshev, Y. V., Orekhov, A. N. (2016). Anti-atherosclerotic effects of garlic preparation in freeze injury model of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Phytomedicine*, 23 (11), pp. 1235-1239.

Tocmo, R., Wu, Y., Liang, D., Fogliano, V., Huang, D. (2017). Boiling enriches the linear polysulfides and the hydrogen sulfide-releasing activity of garlic. *Food Chemistry*, 221, pp. 1867-1873.

Tsai, C. W., Chen, H. W., Sheen, L. Y., Lii, C. K. (2012). Garlic: health benefits and actions. *Biomedicine*, 2 (1), pp. 17-29.

Turkmen, N., Sari, F., Velioglu, Y. S. (2005). The effect of cooking methods on total phenolics and antioxidant activity of selected green vegetables. *Food Chemistry*, 93 (4), pp. 713-718.

UOL. Compostos sulfurados ou tiocompostos [Em linha]. Disponível em <<http://m.alunosonline.uol.com.br/quimica/compostos-sulfurados-ou-tiocompostos.html>>. [Consultado em 5/11/2017].

Upadhyay, R. K. (2017). Nutritional and therapeutic potential of *Allium* vegetables. *Journal of Nutritional Therapeutics*, 6, pp. 18-37.

Vinha, A. F., Alves, R. C., Barreira, S. V., Costa, A. S., Oliveira, M. B. (2015). Impact of boiling on phytochemicals and antioxidant activity of green vegetables consumed in the Mediterranean diet. *Food & Function*, 6 (4), pp. 1157-1163.

Volden, J., Bengtsson, G. B., Wicklund, T. (2009). Glucosinolates, L-ascorbic acid, total phenols, anthocyanins, antioxidant capacities and colour in cauliflower (*Brassica*

Atividade antioxidante do alho (*Allium sativum* L.) quando submetido a diferentes processos tecnológicos

*oleracea* L. ssp. *botrytis*); effects of long-term freezer storage. *Food Chemistry*, 112, pp. 967–976.

Wu, C., Yang, M., Dong, Y., Cheng, Z., Meng, H. (2015). Growth, bolting and yield of garlic (*Allium sativum* L.) in response to clove chilling treatment. *Scientia Horticulturae*, 194, pp. 43-52.