

**Universidade de São Paulo  
Faculdade de Saúde Pública**

**Alho (*Allium sativum*) e produtos: atividade  
antioxidante *in vitro* durante a vida de prateleira**

**Yara Severino de Queiroz**

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Saúde Pública para  
obtenção do título de Mestre em Saúde  
Pública.

Área de Concentração: Nutrição  
Orientadora: Profa. Assoc. Elizabeth  
Aparecida Ferraz da Silva Torres

**São Paulo  
2006**

**Alho (*Allium sativum*) e produtos: atividade antioxidante *in vitro* durante a vida de prateleira**

**Yara Severino de Queiroz**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública para obtenção do título de Mestre em Saúde Pública.

Área de Concentração: Nutrição  
Orientadora: Profa. Assoc. Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva Torres

**São Paulo  
2006**

## **DEDICATÓRIA**

**Ao Neilson**

Por todo o incentivo, amor, companheirismo e paciência. Sempre estive ao meu lado me fazendo acreditar que tudo daria certo.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a DEUS, pela oportunidade de me conceder a vida com muita saúde, e de realizar mais uma etapa importante da minha vida.

Ao meu marido Neilson, pelo apoio de sempre e principalmente pela paciência durante todo este período. Indiretamente você é Mestre como eu, afinal a sua participação em todas as etapas foi muito importante.

Aos meus pais e irmãos que sempre acreditaram na minha capacidade e que me deram a maior “herança”: a formação acadêmica.

À Professora Dra. Elizabeth Torres, pela oportunidade de realizar o mestrado e por toda a orientação concedida. Sempre disposta em me ajudar.

À Professora Dra. Deborah Markowicz, sempre com disposição a transmitir seus conhecimentos que enriqueceram muito este trabalho.

À Professora Dra. Inar Alves de Castro, por suas competentes sugestões que melhoram o conteúdo deste trabalho.

À Professora Dra. Maria Elisabeth Machado, pelas correções, críticas e sugestões que melhoram a apresentação deste trabalho.

Ao Professor Dr. Carlos Ferrari, pela importante colaboração para o desenvolvimento desta dissertação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa.

Aos amigos Dona Lita e Sr. Romeu da empresa Fresh Garlic que me forneceram as amostras para a realização desta dissertação.

À Geni, Emília e Rosana, pela importante colaboração, correções e pela amizade. Vocês tiveram uma participação muito importante neste trabalho.

Aos queridos amigos do laboratório de Bromatologia: Liania, Marcela, Renata e Guilherme que tiveram participação na realização deste trabalho.

À Vanessa Capriles, Luciane Saldanha, Carla Machado, Vanessa Willison, Iramaia, pessoas que tenho muita consideração.

Enfim, agradeço a todos que esteve ao meu lado.

## RESUMO

Queiroz YS. **Alho (*Allium sativum*) e produtos: atividade antioxidante *in vitro* durante a vida de prateleira.** São Paulo: 2006. [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Saúde Pública da USP].

**Objetivo.** A busca por produtos de alho prontos para consumo cresceu na última década. O alho contém compostos fenólicos e organosulfurados, que são responsáveis pelo odor característico, sabor, aroma e ação antioxidante. Este estudo teve como objetivo avaliar a atividade antioxidante e determinar os compostos fenólicos totais em alho *in natura* e em seus produtos comercializados, além de avaliar o impacto dos aditivos (ácido cítrico, metabisulfito de sódio e benzoato de sódio) sobre a atividade antioxidante. **Métodos.** Extratos metanólicos de alho *in natura* (AIN) e seus produtos picado com sal (APS), picado sem sal (AP), frito (AF) e misto – mistura de alho *in natura* com alho desidratado (AM) foram analisados pela vida de prateleira (em três momentos), nos parâmetros: teor de fenólicos totais e atividade antioxidante por três métodos: ensaio DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil), sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico e capacidade protetora da oxidação lipídica utilizando o aparelho Rancimat®. **Resultados.** O teor de fenólicos totais do extrato em relação ao resíduo seco foi maior para o produto frito, nos três momentos. Em relação à atividade antioxidante, o alho frito foi o produto que apresentou melhor atividade para todos os testes. Ao longo da vida de prateleira, a atividade antioxidante diminuiu com o ensaio DPPH, sendo que para os demais testes, aumentou. Os produtos com aditivos apresentaram melhor atividade antioxidante, apesar de apresentarem menor teor de fenólicos totais. **Conclusões.** Este estudo reforçou o potencial antioxidante do alho, portanto o seu consumo pode ser recomendado como parte de uma dieta saudável. Além disso, observou-se que a presença de aditivos melhorou o efeito antioxidante das amostras.

**Descritores:** alho *in natura*, produtos comercializados de alho, atividade antioxidante, vida de prateleira, aditivos.

## SUMMARY

Queiroz YS. **Garlic (*Allium sativum*) and byproducts: *in vitro* antioxidant activity during shelf life period.** São Paulo (BR): 2006. [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo Brazil].

**Objective.** The interest for ready-to-eat garlic byproducts increased in the last decade. Garlic has phenolic and sulfur compounds, which are responsible for the singular flavor and antioxidant activity. This study aimed to evaluate the antioxidant activity (AA) of *in natura* garlic and its commercialized byproducts, and to correlate the data with phenolics contents. The impact of additives (citric acid, sodium metabisulfite and sodium benzoate) on the AA was also evaluated. **Methodology.** Methanolic extracts of *in natura* garlic (ING) and its products, i.e., chopped with salt (CWP), chopped without salt (CS), fried (FG) and mixed garlic - *in natura* garlic with dehydrated garlic (MG) were evaluated in three different moments of the shelf life. This evaluation based on the measurement of the following parameters: total phenolic compounds and AA. The AA were evaluated using three different methods: DPPH (1,1- diphenyl-2-picrylhydrazyl) assay,  $\beta$ -carotene/linoleic acid system and Rancimat® method. **Results.** The total phenolics content of the extract in relation to the dried residue was higher in the fried product, in the three moments. Regarding the AA, fried garlic showed the best activity in all tests. Throughout the shelf life, the AA decreased with the DPPH assays. In contrast, when the other tests were applied, the AA increased. The products with additives showed better antioxidant activity when compared to those without the additives, although the samples with additives showed lower content of total phenolics. **Conclusion.** This study strengthened the antioxidant potential of garlic, therefore its consumption should be recommended as part of a healthy diet. Moreover, it was observed that the presence of additives improved the antioxidant effect of the samples.

**Descriptors:** *in natura* garlic, commercial garlic byproducts, antioxidant activity, shelf life, additives.

## ÍNDICE

|   |      |
|---|------|
| LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....   | v    |
| LISTA DE FIGURAS.....   | viii |
| LISTA DE QUADROS.....   | xi   |
| LISTA DE TABELAS.....   | xii  |
| <br>  |      |
| CAPÍTULO 1 - ALHO: PAPEL NA PROMOÇÃO DE SAÚDE E<br>CAPACIDADE ANTIOXIDANTE - REVISÃO DE LITERATURA..... | 13   |
| <br>  |      |
| 1.1. Alho.....  | 13   |
| 1.1.1. Condições de cultivo, colheita e armazenamento.....  | 14   |
| 1.1.2. Principais variedades.....   | 15   |
| 1.1.3. Classificação.....   | 17   |
| 1.1.4. Composição nutricional.....  | 18   |
| 1.1.5. Compostos organosulfurados encontrados no alho.....  | 19   |
| 1.1.5.1 Compostos organosulfurados em alho fresco intacto.....  | 19   |
| 1.1.5.2. Compostos organosulfurados em alho fresco picado.....  | 22   |
| 1.1.6. Alho x saúde.....  | 23   |
| 1.1.6.1. Atividade antioxidante.....  | 25   |
| 1.2. Antioxidantes: definição, mecanismos de ação, fontes e legislação.....                             | 27   |
| 1.2.1. Estudos com alimentos funcionais – ação antioxidante.....  | 31   |
| 1.2.2. Métodos para determinar a atividade antioxidante em alimentos                                    | 33   |
| 1.3. Radicais livres.....   | 35   |
| 1.4. Oxidação lipídica.....   | 38   |
| 1.5. Estresse oxidativo.....  | 40   |

|  |    |
|--|----|
| CAPÍTULO 2 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> DE ALHO <i>IN NATURA</i> E DE SEUS PRODUTOS COMERCIALIZADOS DURANTE A VIDA DE PRATELEIRA..... | 41 |
| 2.1. INTRODUÇÃO.....   | 41 |
| 2.2. JUSTIFICATIVA.....  | 42 |
| 2.3. OBJETIVOS.....  | 43 |
| 2.3.1. Objetivo Geral.....   | 43 |
| 2.3.2. Objetivos Específicos.....  | 43 |
| 2.4. MATERIAIS E MÉTODOS.....  | 44 |
| 2.4.1. Materiais.....  | 44 |
| 2.4.1.1. Solventes e reagentes.....  | 44 |
| 2.4.1.2. Amostras.....   | 44 |
| 2.4.1.2.1. Características das amostras.....   | 49 |
| 2.4.1.2.2. Peso médio dos dentes de alho.....  | 50 |
| 2.4.2. Métodos.....  | 51 |
| 2.4.2.1. Obtenção do extrato metanólico.....   | 51 |
| 2.4.2.2. Determinação do teor de resíduo seco dos extratos.....  | 53 |
| 2.4.2.3. Quantificação de compostos fenólicos.....   | 53 |
| 2.4.2.4. Avaliação da atividade antioxidante.....  | 54 |
| 2.4.2.4.1. Ensaio radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH).....   | 54 |
| 2.4.2.4.2. Sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoléico.....  | 55 |
| 2.4.2.4.3. Avaliação da capacidade protetora da oxidação lipídica utilizando o aparelho Rancimat®.....   | 56 |
| 2.4.2.5. Análise Estatística.....  | 57 |
| 2.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....   | 58 |
| 2.5.1. Teor de fenólicos totais.....   | 58 |
| 2.5.2. Avaliação da atividade antioxidante.....  | 63 |
| 2.5.2.1. Ensaio radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH).....   | 63 |
| 2.5.2.2. Sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoléico.....  | 70 |
| 2.5.2.3. Avaliação da capacidade protetora da oxidação lipídica utilizando o aparelho Rancimat®.....   | 76 |

|  |     |
|--|-----|
| 2.5.3. Correlações entre as variáveis.....   | 89  |
| 2.6. CONCLUSÃO.....  | 83  |
| 2.7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....   | 85  |
|  |     |
| CAPÍTULO 3 - “INFLUÊNCIA DOS ADITIVOS ALIMENTARES NA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS PRODUTOS DE ALHO”..... | 86  |
|  |     |
| 3.1. INTRODUÇÃO.....   | 86  |
| 3.2. JUSTIFICATIVA.....  | 90  |
| 3.3. OBJETIVOS.....  | 91  |
| 3.3.1. Objetivo Geral.....   | 91  |
| 3.3.2. Objetivos Específicos.....  | 91  |
| 3.4. MATERIAIS E MÉTODOS.....  | 91  |
| 3.4.1. Materiais.....  | 91  |
| 3.4.1.1. Solventes e reagentes.....  | 91  |
| 3.4.1.2. Amostras.....   | 91  |
| 3.4.2. Métodos.....  | 94  |
| 3.4.2.1. Obtenção do extrato metanólico.....   | 94  |
| 3.4.2.2. Determinação do teor de resíduo seco dos extratos.....  | 94  |
| 3.4.2.3. Quantificação dos compostos fenólicos.....  | 94  |
| 3.4.2.4. Avaliação da atividade antioxidante.....  | 95  |
| 3.4.2.4.1. Ensaio radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)....                                      | 95  |
| 3.4.2.4.2. Sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoléico.....  | 95  |
| 3.4.2.4.3. Avaliação da capacidade protetora da oxidação lipídica utilizando o aparelho Rancimat®..... | 96  |
| 3.4.2.5. Análise Estatística.....  | 97  |
| 3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....   | 97  |
| 3.5.1. Teor de fenólicos totais.....   | 97  |
| 3.5.2. Avaliação da atividade antioxidante.....  | 99  |
| 3.5.2.1. Ensaio radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH).....                                       | 99  |
| 3.5.2.2. Sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoléico.....  | 100 |

|  |     |
|--|-----|
| 3.5.2.3. Avaliação da capacidade protetora da oxidação lipídica utilizando o aparelho Rancimat®.....   | 100 |
| 3.6. CONCLUSÃO.....  | 102 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....  | 103 |
| ANEXO 1 - Determinação do teor de umidade das amostras comercializadas de alho.....  | 120 |
| ANEXO 2 – Tabela - Valores médios e desvio padrão (dp) da atividade antioxidante, pelo ensaio DPPH, do extrato metanólico do alho <i>in natura</i> e de seus produtos comercializados dos momentos 1, 2 e 3 (n* = 9).....  | 123 |
| ANEXO 3 – Tabela - Valores médios e desvio padrão (dp) da inibição da oxidação lipídica (IOL), pelo sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoléico, do extrato metanólico do alho <i>in natura</i> e de seus produtos comercializados dos momentos 1, 2 e 3 (n* = 9)..... | 124 |
| ANEXO 4 – Tabela - Valores médios e desvio padrão (dp) do índice de atividade antioxidante (IAA), utilizando o aparelho Rancimat, do extrato metanólico do alho <i>in natura</i> e de seus produtos comercializados dos momentos 1, 2 e 3 (n* = 6).....              | 125 |
| ANEXO 5 – Figura - Atividade antioxidante, pelo ensaio DPPH, do extrato metanólico dos diferentes produtos de alho com e sem aditivos.....   | 126 |
| ANEXO 6 – Figura - Porcentagem de inibição da oxidação lipídica (% IOL), pelo sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoléico, dos produtos de alho com e sem aditivos.....  | 127 |
| ANEXO 7 – Figura – Índice de atividade antioxidante (IAA), medido pelo aparelho Rancimat®, dos produtos de alho com e sem aditivos.....  | 128 |

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

|                  |   |
|------------------|---|
| AA               | atividade antioxidante                          |
| Abs.             | absorbância                                     |
| a.C.             | antes de Cristo                                 |
| AF               | alho frito                                      |
| AGE              | extrato de alho envelhecido                     |
| AIN              | alho <i>in natura</i>                           |
| AH               | antioxidante                                    |
| AM               | alho misto                                      |
| AP               | alho picado sem sal                             |
| APS              | alho picado com sal                             |
| ATP              | energia (adenosina trifosfato)                  |
| BHA              | butil hidroxianisol                             |
| BHT              | butil hidroxitolueno                            |
| cm               | centímetro                                      |
| CP               | correlação de Pearson                           |
| DAS              | dialil sulfito                                  |
| DADS             | dialil dissulfito                               |
| DCV              | doenças cardiovasculares                        |
| DNA              | ácido desoxiribonucléico                        |
| dp               | desvio padrão                                   |
| DPPH             | radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil            |
| e <sup>-</sup>   | elétron   |
| EAG              | equivalentes de ácido gálico                    |
| ERN              | espécies reativas do metabolismo de nitrogênio  |
| ERO              | espécies reativas do metabolismo do oxigênio    |
| FRAP             | ensaio do poder antioxidante em redução férrica |
| Fe <sup>+2</sup> | íon ferroso                                     |
| Fe <sup>+3</sup> | íon férrico                                     |
| g                | grama   |

|   |                                  |
|---|----------------------------------|
| GSH   | glutathiona reduzida             |
| GSH-Px  | glutathiona peroxidase           |
| h   | horas                            |
| H <sup>+</sup>                                | íon hidrogênio                   |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                 | peróxido de hidrogênio           |
| IAA   | índice de atividade antioxidante |
| IOL   | inibição da oxidação lipídica    |
| L   | litro                            |
| L <sup>·</sup>                                | radical livre lipídico           |
| LH  | ácido graxo insaturado           |
| LO <sup>·</sup>                               | radical alcoxila                 |
| LOO <sup>·</sup>                              | radical peroxila                 |
| LOOH  | hidroperóxido                    |
| μg  | micrograma                       |
| mg  | miligrama                        |
| mL  | mililitro                        |
| mn  | nanômetro                        |
| mm  | milimitro                        |
| m/m   | relação massa e massa            |
| m/v   | relação massa e volume           |
| n   | número de amostras               |
| NAC   | acetil cisteína                  |
| Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>               | sulfito de sódio                 |
| NaHSO <sub>3</sub>                            | sulfito ácido de sódio           |
| Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub> | metabisulfito de sódio           |
| NDGA  | ácido nordihidroguaiarético      |
| NO <sup>·</sup>                               | óxido nítrico                    |
| NO <sub>2</sub> <sup>·</sup>                  | dióxido de nitrogênio            |
| NS  | nível de significância           |
| O <sub>2</sub>                                | oxigênio molecular               |
| O <sub>2</sub> <sup>·-</sup>                  | radical superóxido               |
| <sup>1</sup> O <sub>2</sub>                   | oxigênio singlete                |

|                   |   |
|-------------------|---|
| OH <sup>-</sup>   | radical hidroxila                                       |
| ONOO <sup>-</sup> | peroxinitrito   |
| ORAC              | ensaio da capacidade de absorbância do radical oxigênio |
| %                 | porcentagem   |
| p                 | nível descritivo  |
| PA                | padrão analítico  |
| ppm               | parte por milhão  |
| PG                | galato de propila                                       |
| rpm               | rotações por minuto                                     |
| SAC               | S-alicisteína   |
| SEC               | S-etil cisteína   |
| SO <sub>2</sub>   | dióxido de enxofre                                      |
| SOD               | superóxido dismutase                                    |
| TBARS             | substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico           |
| TBHQ              | terbutilhidroquinona                                    |
| TI                | tempo de indução  |
| UV                | ultra violeta   |
| ΔT                | variação de temperatura                                 |

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1</b> - Alho.....  | 13 |
| <b>Figura 2</b> - Reações químicas dos principais compostos organosulfurados encontrados no alho.....  | 21 |
| <b>Figura 3</b> - Formação do composto organosulfurado alicina.....  | 25 |
| <b>Figura 4</b> - Esquema das amostras obtidas de alho.....  | 46 |
| <b>Figura 5</b> - Alho <i>in natura</i> e seus produtos comercializados.....   | 48 |
| <b>Figura 6</b> - Esquema da extração das diferentes amostras de alho, segundo NUUTILA <i>et al.</i> (2003), com modificações.....   | 52 |
| <b>Figura 7</b> - Teor de fenólicos totais (g/100g) do alho <i>in natura</i> e de seus produtos no decorrer da vida de prateleira.....   | 62 |
| <b>Figura 8</b> - Teor de fenólicos totais em relação ao resíduo seco do alho <i>in natura</i> e de seus produtos no decorrer da vida de prateleira.....                         | 63 |
| <b>Figura 9</b> - Atividade antioxidante, pelo ensaio DPPH, do extrato metanólico do alho <i>in natura</i> e de seus produtos comercializados, segundo os momentos (n* = 9)..... | 64 |
| <b>Figura 10</b> - Atividade antioxidante, pelo ensaio DPPH, dos extratos de alho <i>in natura</i> e de seus produtos comercializados no decorrer da vida de prateleira....      | 68 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 11</b> - Curva cinética da atividade antioxidante, pelo ensaio DPPH, do extrato metanólico do alho <i>in natura</i> e de seus produtos do momento 1.....   | 69 |
| <b>Figura 12</b> - Curva cinética da atividade antioxidante, pelo ensaio DPPH, do extrato metanólico do alho <i>in natura</i> e de seus produtos do momento 2.....   | 69 |
| <b>Figura 13</b> - Curva cinética da atividade antioxidante, pelo ensaio DPPH, do extrato metanólico do alho <i>in natura</i> e de seus produtos do momento 3.....   | 70 |
| <b>Figura 14</b> - Inibição da oxidação lipídica (IOL), pelo sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoléico, do extrato metanólico do alho <i>in natura</i> e de seus produtos comercializados dos momentos 1, 2 e 3 ( $n^* = 9$ )..... | 71 |
| <b>Figura 15</b> - Inibição da oxidação lipídica (IOL), pelo sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoléico, dos extratos de alho <i>in natura</i> e de seus produtos comercializados no decorrer da vida de prateleira.....            | 73 |
| <b>Figura 16</b> - Curva cinética da inibição da oxidação lipídica, pelo sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoléico, do extrato metanólico do alho <i>in natura</i> e de seus produtos do momento 1.....                            | 74 |
| <b>Figura 17</b> - Curva cinética da inibição da oxidação lipídica, pelo sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoléico, do extrato metanólico do alho <i>in natura</i> e de seus produtos do momento 2.....                            | 75 |
| <b>Figura 18</b> - Curva cinética da inibição da oxidação lipídica, pelo sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoléico, do extrato metanólico do alho <i>in natura</i> e de seus produtos do momento 3.....                            | 75 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 19</b> - Índice de atividade antioxidante (IAA), utilizando o aparelho Rancimat, do extrato metanólico do alho <i>in natura</i> e de seus produtos comercializados dos momentos 1, 2 e 3 ( $n^* = 6$ )..... | 76 |
| <b>Figura 20</b> - Índice de atividade antioxidante (IAA), utilizando o aparelho Rancimat, do extrato metanólico do alho <i>in natura</i> e de seus produtos comercializados no decorrer da vida de prateleira.....   | 79 |
| <b>Figura 21</b> - Estrutura química do ácido cítrico.....  | 88 |
| <b>Figura 22</b> - Estrutura química do benzoato de sódio.....  | 89 |
| <b>Figura 23</b> - Estrutura química do metabisulfito de sódio.....   | 89 |
| <b>Figura 24</b> - Esquema das amostras obtidas de alho sem aditivos (lote 4).....  | 93 |

## LISTA DE QUADROS

|   |    |
|---|----|
| <b>Quadro 1</b> - Principais variedades de alho e suas características.....   | 16 |
| <b>Quadro 2</b> - Melhores épocas de plantio e colheita do alho, segundo o estado ou a região.....                                  | 17 |
| <b>Quadro 3</b> - Classificação do alho por tamanho e cor.....  | 17 |
| <b>Quadro 4</b> - Propriedades bioativas do alho.....   | 23 |
| <b>Quadro 5</b> - Limite máximo de uso de aditivos em alimentos no Brasil.....  | 29 |
| <b>Quadro 6</b> - Alho <i>in natura</i> e seus produtos comercializados, segundo a vida de prateleira e o momento das análises..... | 47 |

## LISTA DE TABELAS

|   |     |
|---|-----|
| <b>Tabela 1</b> - Composição Nutricional do Alho.....   | 18  |
| <b>Tabela 2</b> - Número e peso médio (g) dos dentes de alho em dois bulbos de cada lote.....   | 50  |
| <b>Tabela 3</b> - Teores médios e desvio padrão (dp) de resíduo seco e de fenólicos totais do alho <i>in natura</i> e de seus produtos comercializados dos momentos 1, 2 e 3.....                           | 59  |
| <b>Tabela 4</b> - Correlação entre as variáveis do alho <i>in natura</i> e de seus produtos comercializados dos momentos 1, 2 e 3.....  | 80  |
| <b>Tabela 5</b> - Teores médios e desvio padrão (dp) de resíduo seco e de fenólicos totais das amostras de alho com e sem aditivos.....   | 98  |
| <b>Tabela 6</b> - Valores médios e desvio padrão (dp) da atividade antioxidante, pelo ensaio DPPH, do extrato metanólico das diferentes produtos de alho com e sem aditivos.....                            | 99  |
| <b>Tabela 7</b> - Valores médios e desvio padrão (dp) da porcentagem de inibição da oxidação lipídica (% IOL), pelo sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoléico, dos produtos de alho com e sem aditivos..... | 100 |
| <b>Tabela 8</b> - Valores médios e desvio padrão (dp) do índice de atividade antioxidante (IAA), medido pelo aparelho Rancimat®, dos produtos de alho com e sem aditivos.....                               | 101 |

# CAPÍTULO 1

## ALHO: PAPEL NA PROMOÇÃO DE SAÚDE E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE - REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1. Alho

O alho (*Allium sativum*) (Figura 1) foi descoberto no Egito, na data de 3.700 a.C., onde era usado como medicamento (FENWICK e HANLEY 1985; BLOCK 1985).

Segundo a ANVISA (2005), o alho é considerado uma especiaria. Por definição, especiarias são os produtos constituídos de partes (raízes, rizomas, bulbos, cascas, folhas, flores, frutos, sementes e talos) de uma ou mais espécies vegetais, tradicionalmente utilizadas para agregar sabor ou aroma aos alimentos e bebidas.

Este vegetal pertence à família *Liliaceae*, que contém mais de 700 espécies, incluindo cebola, alho-poró e cebolinha. O porte da planta varia entre 50 a 70 cm de altura, dependendo da variedade, e suas raízes atingem até 50 cm de profundidade. Suas folhas, estreitas e alongadas, são recobertas por uma camada de cera (BARRERA e CAMARGO 1985).



Figura 1- Alho.

Em 1999, a produção mundial de alho foi de 9.280.188 toneladas, sendo a China o maior produtor mundial (5.964.066 toneladas), seguida da Índia (517.700 toneladas). A Argentina foi o maior produtor da América do Sul em 1999, com uma

produção de 150.000 toneladas, representando aumento de 1,3 % em relação ao ano anterior (FAO 2000, citado por HOLUB *et al.*, 2002). Já a produção mundial em 2003, foi de aproximadamente de oito milhões de toneladas (EMBRAPA 2004).

No Brasil, a produção de alho em 2004 foi de aproximadamente 89.674 toneladas. Essa quantidade coloca o país como o 14º maior produtor mundial de alho (OLIVEIRA *et al.* 2004; BAGHALIAN *et al.* 2005).

O alho tem grande importância econômica e social no Brasil. O valor total da produção é estimado em mais de R\$ 234 milhões por ano. É uma hortaliça cultivada, na grande maioria, por pequenos produtores, com utilização intensa de mão-de-obra. Estima-se que sejam criados cerca de 25.000 empregos diretos na cadeia produtiva (EMBRAPA 2004).

A importância econômica da cultura do alho tem aumentado sensivelmente nos últimos anos, não só pelo seu uso generalizado como especiaria, mas também por algumas qualidades terapêuticas que lhe são atribuídas. De fato, o Brasil é um dos países que mais consome alho no mundo, sendo que a maior parte é comercializada na forma *in natura*, ainda que o consumo de pastas e outros produtos processados de alho venham crescendo gradativamente (OLIVEIRA *et al.* 2003; OLIVEIRA *et al.* 2004).

### **1.1.1. Condições de cultivo, colheita e armazenamento**

As regiões sul e sudeste do Brasil são as mais propícias para o cultivo do alho. A faixa de temperatura média mais indicada para o bom desenvolvimento das plantas varia entre 13 °C e 24 °C. É necessário que a temperatura no inverno seja inferior a 15 °C, porque isso estimula a formação do bulbo (cabeça). Temperaturas entre 20 °C e 30 °C podem prejudicar a formação de bulbo, e acima de 30 °C não favorecem a sua formação com bom aspecto comercial. O alho é cultivado na época fria do ano que, na maioria das regiões produtoras, é também a mais seca (MENEZES SOBRINHO *et al.* 1993; MAROUELLI *et al.* 2002; EMBRAPA 2004).

Os solos muito argilosos (pesados) devem ser evitados porque deformam os bulbos e dificultam a colheita. Os solos arenosos também não são adequados, pois

retêm pouca umidade e são pobres em nutrientes. Areno-argilosos e argilo-arenosos (chamados solos leves) são os mais indicados. O pH do solo ideal para o cultivo do alho está em torno de 6,5 (BARRERA e CAMARGO 1985; MENEZES SOBRINHO *et al.* 1993).

O alho é plantado por bulbilhos (dentes). O plantio manual consiste de abertura do sulco, distribuição e incorporação do adubo, semeadura e cobertura dos bulbilhos (BARRERA e CAMARGO 1985).

A hora certa de colher o alho depende da duração do ciclo e do estado das folhas. Preferencialmente, a colheita deve ser feita num dia de sol, para que a cura ou secagem comece na própria lavoura (durante 3 ou 4 dias). A segunda parte da cura é feita em galpões, à sombra. Durante 20 a 60 dias (com folhas e raízes) devem ser estendidas sobre estrados, telas ou esteiras. O galpão deve ser seco, escuro e bem ventilado. Depois da cura ou depois de ser limpo, o alho poderá ser armazenado em caixas. O armazenamento também pode ser feito em câmara fria por até 8 meses a 0 °C e umidade relativa de 70 a 75 % (MENEZES SOBRINHO *et al.* 1993).

### **1.1.2. Principais variedades**

As variedades de alho disponíveis no Brasil diferem a partir da duração do ciclo de produção. Há variedades precoces (ciclo curto, de 4 a 4,9 meses entre o plantio e a colheita), médias (5 a 5,9 meses) e tardias (ciclo longo, acima de 5,9 meses). Também, há diferenças quanto à exigência de frio, número de dentes por cabeça e outras características apresentadas no quadro 1. Neste quadro, verifica-se as variedades mais propensas à formação de palitos (dentes com peso inferior a 1 g), pois estes pioram a classificação do alho e, conseqüentemente, seu valor comercial (BARRERA e CAMARGO 1985; MENEZES SOBRINHO *et al.* 1993).

Quadro 1 - Principais variedades de alho e suas características.

| <b>Ciclo</b>                            | <b>Nome</b>           | <b>Média de dentes por cabeça</b> | <b>Formação de palitos</b> | <b>Exigência de frio e dias longos</b> |
|---|-----------------------|-----------------------------------|----------------------------|--|
| <b>Curto<br/>4 a 4,9<br/>meses</b>      | Branco-mineiro        | 20 a 25                           | sim                        | pequena                                |
|   | Juréia                | 20 a 25                           | rara                       | pequena                                |
|   | Cajuru-precoce        | 20 a 25                           | sim                        | pequena                                |
|   | Peruano               | 6 a 12                            | não                        | pequena                                |
|   | Cateto-roxo           | 26 a 30                           | sim                        | pequena                                |
| <b>Médio<br/>5,0 a 5,9<br/>meses</b>    | Amarante              | 8 a 12                            | não                        | média                                  |
|   | Gigante               | 8 a 15                            | não                        | média                                  |
|   | Chinês                | 8 a 12                            | não                        | média                                  |
|   | Gigante-roxo          | 8 a 12                            | não                        | média                                  |
|   | Roxão                 | 8 a 12                            | não                        | média                                  |
|   | Caturra               | 8 a 12                            | não                        | média                                  |
|   | Dourados <sup>1</sup> | 20 a 30                           | sim                        | média                                  |
| <b>Longo<br/>acima de<br/>5,9 meses</b> | Centenário            | 20 a 35                           | sim                        | pequena                                |
|   | Contestado            | 8 a 12                            | não                        | grande                                 |
|   | Roxo-pérola-caçador   | 8 a 12                            | não                        | grande                                 |
|   | Quitéria <sup>2</sup> | 7 a 12                            | não                        | grande                                 |
|   | Caxiense              | 7 a 10                            | não                        | grande                                 |
|   | Caçapava              | 7 a 12                            | não                        | grande                                 |
|   | Tupamaro              | 10 a 15                           | não                        | grande                                 |

Fonte: Barrera e Camargo 1985

<sup>1</sup> o ciclo da variedade dourados pode durar 6 meses.

<sup>2</sup> o ciclo desta variedade é menor quando plantada em setembro.

No Quadro 2, pode-se verificar as épocas de plantio e colheita para os estados produtores.

Quadro 2 - Melhores épocas de plantio e colheita do alho, segundo o estado ou a região.

| Estado ou região                | Plantio           | Colheita            |
|---------------------------------|-------------------|---------------------|
| <b>Minas Gerais</b>             | fevereiro a abril | julho a outubro     |
| <b>São Paulo</b>                | fevereiro a abril | julho a outubro     |
| <b>Santa Catarina</b>           | junho a julho     | novembro a dezembro |
| <b>Paraná</b>                   | março a julho     | julho a dezembro    |
| <b>Rio Grande do Sul</b>        | março a setembro  | julho a janeiro     |
| <b>Góias e Distrito Federal</b> | março a abril     | julho a outubro     |
| <b>Nordeste</b>                 | abril a maio      | julho a outubro     |
| <b>Roraima e Rondônia</b>       | abril a maio      | julho a outubro     |

Fonte: Barrera e Camargo 1985

### 1.1.3. Classificação

A classificação do alho para consumo baseia-se na Comissão Técnica de Normas e Padrões do Ministério da Agricultura (quadro 3).

Quadro 3 - Classificação do alho por tamanho e cor.

| Grupo           | Nobre<br>Comum | Até 20 dentes por cabeça             |
|-----------------|----------------|--------------------------------------|
|                 |                | Mais de 20 dentes por cabeça         |
| <b>Subgrupo</b> | 1              | Casca branca - Película branca       |
|                 | 2              | Casca roxa - Película branca         |
|                 | 3              | Casca roxa - Película roxa           |
| <b>Classe</b>   | 3              | diâmetro horizontal entre 32 e 37 mm |
|                 | 4              | diâmetro horizontal entre 37 e 42 mm |
|                 | 5              | diâmetro horizontal entre 42 e 47 mm |
|                 | 6              | diâmetro horizontal entre 47 e 56 mm |
|                 | 7              | diâmetro horizontal acima de 56 mm   |

Fonte: Barrera e Camargo 1985

### 1.1.4. Composição nutricional

Apesar do uso frequente do alho em diversos tipos de preparações culinárias, sua importância nutricional (tabela 1) na dieta é relativamente pequena, uma vez que é utilizado em pequenas quantidades. Em contrapartida, foram identificados vários compostos bioativos, sendo os de maior destaque os organosulfurados, cuja importância será discutida no próximo item.

Tabela 1 – Composição Nutricional do Alho.

| Nutrientes                    | Unidade   | Valor por 100g |
|-------------------------------|-----------|----------------|
| Calorias                      | Kcal      | 149,00         |
| Água                          | g         | 58,58          |
| Proteínas                     | g         | 6,36           |
| Lipídios                      | g         | 0,50           |
| Ácidos Graxos saturados       | g         | 0,09           |
| Ácidos graxos monoinsaturados | g         | 0,01           |
| Ácidos graxos poliinsaturados | g         | 0,25           |
| Colesterol                    | mg        | 0,00           |
| Carboidratos por diferença    | g         | 33,06          |
| Fibra total dietética         | g         | 2,10           |
| Cinzas                        | g         | 1,50           |
| Cálcio                        | mg        | 181,00         |
| Ferro                         | mg        | 1,70           |
| Magnésio                      | mg        | 25,00          |
| Fósforo                       | mg        | 153,00         |
| Potássio                      | mg        | 401,00         |
| Sódio                         | mg        | 17,00          |
| Zinco                         | mg        | 1,16           |
| Cobre                         | mg        | 0,30           |
| Manganês                      | mg        | 1,67           |
| <b>Selênio</b>                | <b>µg</b> | <b>14,20</b>   |
| <b>Vitamina C</b>             | <b>mg</b> | <b>31,20</b>   |
| Tiamina                       | mg        | 0,20           |
| Riboflavina                   | mg        | 0,11           |
| Niacina                       | mg        | 0,70           |
| Ácido Pantotênico             | mg        | 0,6            |
| Vitamina B6                   | mg        | 1,24           |
| Folato total                  | µg        | 3,00           |
| Vitamina B12                  | µg        | 0,00           |

Fonte: USDA Nutrient Database for Standard References, release 14 (julho 2001)

### **1.1.5. Compostos organosulfurados encontrados no alho**

O alho contém 33 compostos organosulfurados, sendo que em cada grama de alho fresco podem ser encontrados de 11 a 35 mg destes compostos (FENWICK e HANLEY 1985).

O teor de compostos organosulfurados no alho, como a alicina, é bastante variável, dependendo de sua variedade, composição do solo, grau de maturação, condições climáticas, além de etapas posteriores da cadeia produtiva, como processamento, armazenamento e manipulação. O controle destas variações é muito importante, considerando que menores teores dos compostos citados irão resultar na redução da eficácia farmacológica que esta especiaria possui (HOLUB *et al.* 2002).

#### **1.1.5.1 Compostos organosulfurados em alho fresco intacto**

Os compostos organosulfurados dos dentes de alho intactos são os sulfoxidos de cisteína (principalmente alliina, e em menor quantidade a metiina e a isoalliina) e as  $\gamma$ -glutamilcisteínas (principalmente  $\gamma$ -glutamil-S-*trans*-1-propenilcisteína e menor quantidade da  $\gamma$ -glutamil-S-alilcisteína e da  $\gamma$ -glutamil-S-metilcisteína). Sulfoxidos de cisteína são compostos de cor branca, cristalinos, não possuem odor quando sólidos, sendo altamente solúveis em água e insolúveis na maior parte dos solventes orgânicos. Os compostos  $\gamma$ -glutamilcisteínas servem como reserva para a formação das cisteínas, que posteriormente são convertidos em sulfoxidos de cisteína, conforme apresentado na figura 2, item a. Durante o plantio, a germinação e o armazenamento, apenas uma parte das  $\gamma$ -glutamilcisteínas são gradualmente hidrolisadas e depois oxidadas para formarem os sulfoxidos de cisteínas pelo aumento dos níveis da enzima  $\gamma$ -glutamiltranseptidase (há aumento da formação, conforme o decréscimo da temperatura). As  $\gamma$ -glutamilcisteínas que não foram convertidas a sulfoxidos de cisteína, transformam em S-alilcisteína (SAC) e S-1-propenilcisteína, quando incubadas em água por um longo período (figura 2, item c). Os sulfoxidos de cisteínas (8 - 19 mg/g de alho fresco) e as  $\gamma$ -glutamilcisteínas (5 - 16 mg/g de alho fresco) somam aproximadamente 95% do total de enxofre nos alhos

frescos. Aproximadamente 85% dos sulfoxidos de cisteína são encontrados no bulbo, 12% nas folhas e 2% nas raízes, enquanto as  $\gamma$ -glutamilcisteínas são apenas encontradas nos bulbos (HOLUB *et al.* 2002).

a) Durante o plantio, a germinação e armazenamento dos bulbos intactos

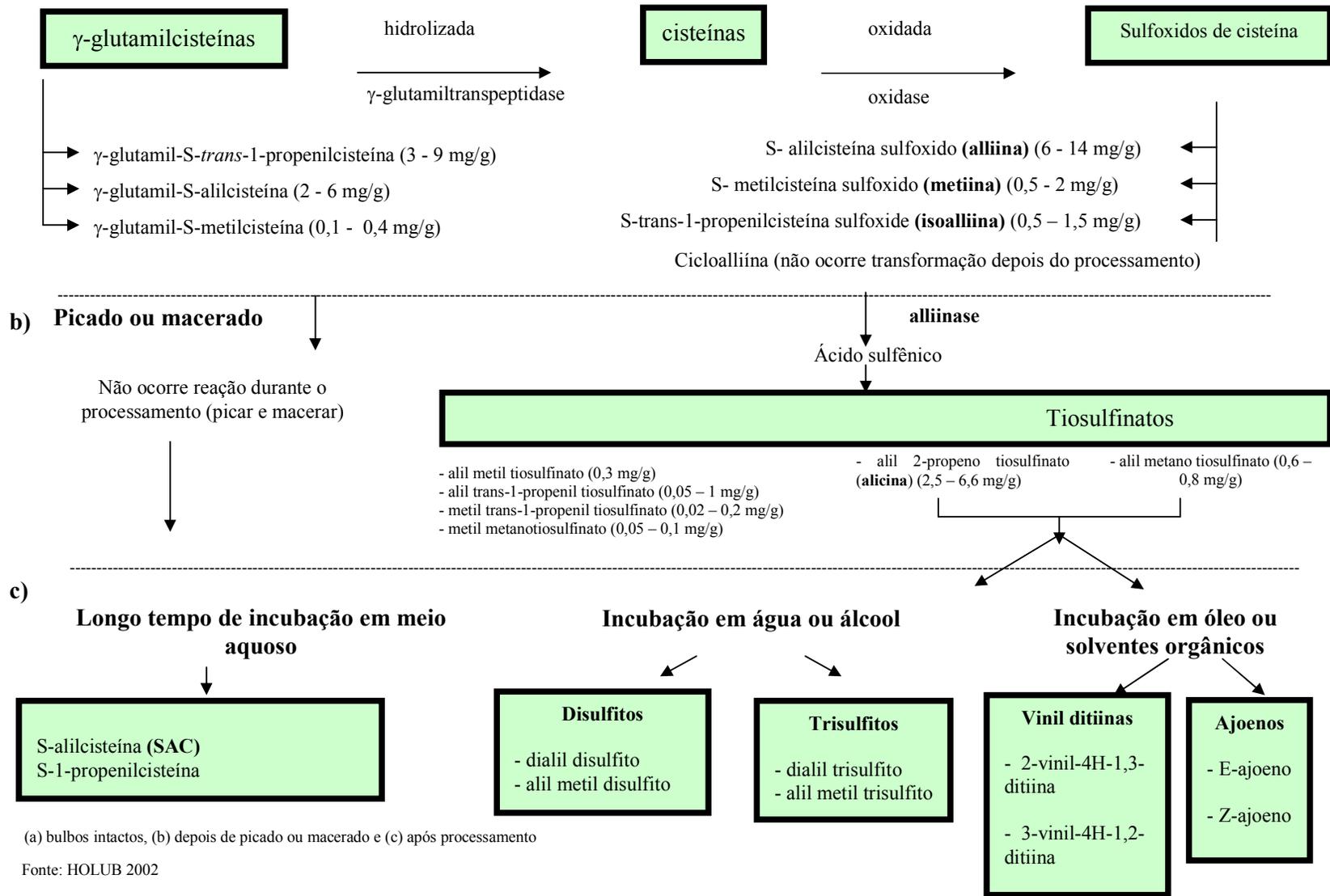


Figura 2 - Reações químicas dos principais compostos organosulfurados encontrados no alho.

### 1.1.5.2. Compostos organosulfurados em alho fresco picado

Quando o alho é picado mecanicamente, a alliinase cataliza a conversão dos sulfoxidos de cisteína para a forma biologicamente ativa tiosulfinatos, reação intermediada pelo ácido sulfênico (BLOCK 1992), conforme apresentado na figura 2, item b. A enzima alliinase é localizada em poucas células vasculares do feixe da bainha, em volta da veia ou floema, enquanto alliina e outros sulfoxidos de cisteína são encontrados nas células de estocagem dos mesófilos. Esta enzima é aproximadamente 10 vezes mais abundante nos dentes de alho do que nas folhas (ELLMORE e FELDBERG 1994; HOLUB *et al.* 2002) e é responsável por pelo menos 10% do total de proteínas nos dentes de alho. A atividade da alliinase é dependente do pH e da temperatura, tendo uma ótima atividade em pH 5 a 10, podendo ser desnaturada irreversivelmente em pH 1,5 a 3,0 (KREST e KEUSGEN 1999).

Acredita-se que os tiosulfinatos volatéis e reativos (2 a 9 mg/g em alho fresco picado) sejam os compostos ativos com propriedades medicinais e fisiológicas. São formados quando o alho é picado, macerado ou mastigado, e são responsáveis pela produção do odor característico. O composto alil 2-propeno tiosulfinato, mais conhecido como alicina, é o produto mais abundante dentre os tiosulfinatos (70%), sendo o alil metano tiosulfinato o segundo mais abundante (18%). Vários outros tiosulfinatos são formados em menores concentrações. A conversão de sulfoxidos de cisteína em tiosulfinatos ocorre de 0,2 a 0,5 minutos em temperatura ambiente para a alicina e para o alil-metil-tiosulfinato de 1,5 a 5,0 minutos. A estabilidade dos tiosulfinatos depende da concentração e da pureza, bem como do solvente usado e da temperatura a qual ocorre a reação. A alicina é menos solúvel em água e mais em solventes orgânicos, especialmente os polares. A vida média da alicina em água é de 30 dias e em ácido cítrico é de 60 dias (LAWSON 1993, citado por HOLUB 2002).

Os tiosulfinatos passam por várias transformações para formarem outras substâncias estáveis, como os di e trissulfitos, vinil ditiinas, ajoenos (figura 2, item c). Estas reações são dependentes de temperatura, pH e condições de solventes. A incubação da alicina ou do alil metano tiosulfinato em solventes de baixa polaridade

ou em óleo, produz principalmente as vinil ditiinas e em menores quantidades os ajoenos. Por outro lado, se estes compostos forem incubados em água ou álcool, diferentes produtos são formados como, disulfítos, trissulfítos, além dos ajoenos e vinil ditiinas dependendo da pureza da alicina ou dos dentes de alho (HOLUB *et al.* 2002).

### 1.1.6. Alho x saúde

Vários estudos utilizando o alho *in natura* ou seus produtos foram realizados, principalmente em relação aos seus efeitos nas doenças cardiovasculares (WARSHAFSKY *et al.* 1993; SILAGY e NEIL 1994; DURAK *et al.* 2004). Entre as propriedades benéficas identificadas, foram descritas: redução das concentrações séricas de LDL-colesterol e triglicerídeos, redução da pressão arterial, aumento da atividade fibrinolítica e inibição da agregação plaquetária. Outros estudos indicam que o consumo de alho promove outras atividades, como ação antimicrobiana, efeitos antivirais, atividades imunológicas, anticancerígenas e antioxidante (BLOCK 1985; BENKEBLIA 2004; AUGER 2004). Porém, os estudos diferenciam no tipo de preparação e dosagem, além de serem diferenciados em aspectos metodológicos, levando, muitas vezes, a resultados conflitantes. O quadro 4 resume alguns estudos que avaliaram as propriedades bioativas do alho.

Quadro 4 – Propriedades bioativas do alho.

| Autores/Ano                     | Objetivo                      | Forma de administração do alho | Características   | Resultados  |
|---------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|---|---|
| Warshafsky <i>et al.</i> (1993) | Colesterol e pressão arterial | <i>in natura</i>               | Meta-análise de 5 estudos.<br>½ a 1 dente de alho / dia   | Redução de 9 a 12 % do colesterol total e 9 % da pressão arterial |
| Silagy e Neil (1994)            | Colesterol                    | <i>in natura</i>               | Meta-análise de 16 estudos, 592 indivíduos, alho em pó (600 – 900 mg/dia) ou alho fresco (10 – 20 g/dia), de 1 a 10 meses | Redução de 12 % do colesterol, a partir da quarta semana          |
| Morris <i>et al.</i> (1995)     | Agregação Plaquetária         | Extrato de alho                | Duplo-cego, randomizado, placebo-controlado   | Sem efeito  |

continuação...

...continuação

| <b>Autores/Ano</b>             | <b>Objetivo</b>   | <b>Forma de administração do alho</b>   | <b>Características</b>  | <b>Resultados</b>   |
|--------------------------------|---|---|---|---|
| Steiner <i>et al.</i> (1996)   | Colesterol, lipoproteína e pressão arterial                               | Extrato de alho envelhecido (7,2 g), 6 meses  | Duplo-cego, cross over, homens moderadamente hipercolesterolêmicos            | Redução de 6 % no colesterol total, 4% na LDL e 5,5 % na pressão sistólica  |
| Berthold <i>et al.</i> (1998)  | Lipoproteínas, absorção e síntese do colesterol                           | Óleo de alho destilado a vapor (5 mg, 2x/dia)   | Duplo-cego, randomizado   | Sem efeito  |
| Isaacshon <i>et al.</i> (1998) | Colesterol  | 900 mg/dia de alho em pó (Kwai) 12 semanas  | Randomizado, placebo-controlado, pacientes hipercolesterolêmicos              | Sem efeito  |
| McCrintle <i>et al.</i> (1998) | Colesterol, lipoproteínas, triglicerídios                                 | 300 mg de extrato de alho, 3x/dia, 8 semanas  | 30 pacientes (8 – 18 anos), hiperlipidêmicos (tipo familiar)                  | Sem efeito  |
| Durak <i>et al.</i> (2004)     | Colesterol, pressão arterial  | 10 g de alho/dia, período de 4 meses  | 23 voluntários hipercolesterolêmicos, sendo 13 hipertenso e 13 normotenso     | Redução do nível de colesterol LDL, VLDL, triglicerídio e aumento do HDL. Diminuição significativa da PA do grupo hipertenso. |
| Khosla <i>et al.</i> (2004)    | Atividade protetora gástrica e atividade antioxidante                     | 0,125; 0,25 e 0,5 mg/Kg de óleo de alho. Administração do óleo após 30 min de ingerir o etanol (indução dos danos da mucosa gastrointestinal) | Modelo animal: ratos Wistar, 5 grupos com 12 animais em cada.                 | Doses de 0,25 e 0,5 mg/Kg causou diminuição de úlceras e da peroxidação lipídica.   |
| Singi <i>et al.</i> (2005)     | Pressão arterial  | 1 mg de extrato hidroalcóolico seco de alho, dosados no tempo 0, 15, 30, 45, 60 e 120 segundos  | Modelo animal: ratos machos com peso em média de 400 g e em jejum de 12 horas | Redução de 19 % da pressão arterial média.  |
| Kim <i>et al.</i> (2005)       | Formação de radicais livres (RL) e peroxidação da membrana lipídica (PML) | Composto dialil disulfito (DADS) nas concentrações de 0, 10, 25, 50, 100 e 200 µm   | Modelo animal: células neurais de ratos.                                      | Níveis de RL e PML aumentaram com doses de DADS acima de 25 µm  |

### 1.1.6.1. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante das plantas da família *Allium* tem sido motivo de vários estudos. Especialmente, alhos e seus diferentes extratos têm demonstrado propriedades antioxidantes em diferentes modelos *in vitro* (YIN *et al.* 2002; HOLUB *et al.* 2002; WETTASINGHE *et al.* 2002). Esta propriedade é atribuída às diferentes variedades de compostos organosulfurados e seus precursores, que são encontrados nesta especiaria (KIM *et al.* 1997; LAMPE 1999). Vários estudos demonstraram que a alicina, S-alilcisteína, S-alilmercaptocisteína, dialil sulfíto (DAS), dialil dissulfíto (DADS), e o dialil trissulfíto são compostos voláteis do alho que possuem atividade antioxidante (EGEN *et al.* 1992; KIM *et al.* 1997; BOREX 2001; YIN *et al.* 2002).

A alicina é o composto ativo mais conhecido do alho, representando cerca de 70% de seus compostos organosulfurados. Esta substância é produzida pela interação do aminoácido não protéico aliina, abundante nos dentes de alho, com a enzima aliinase (figura 3). Sua formação é influenciada pela maceração do alho, durante o processo de secagem, pela temperatura em que o alho é seco e pela umidade, além de diferenças de solo, conforme mencionado anteriormente (KRIS-ETHERTON *et al.* 2002; BAGHALIAN *et al.* 2005).

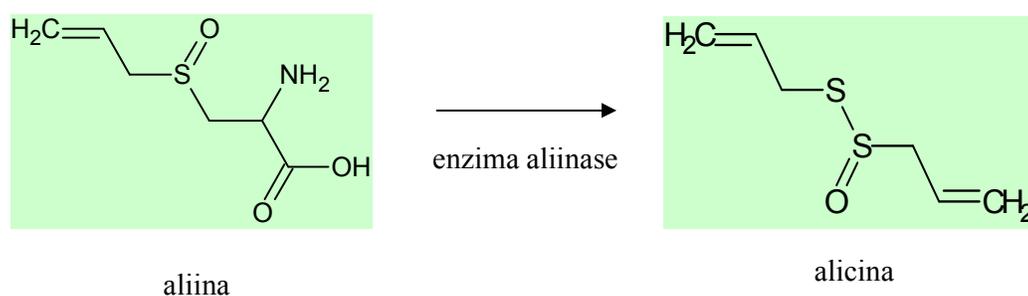


Figura 3 – Formação do composto organosulfurado alicina.

LAWSON *et al.* (1998), citado por NUUTILA (2003) verificaram em modelo animal que a alicina em baixa concentração foi responsável pela atividade antioxidante, porém em alta concentração este composto apresentou efeito pró-oxidante.

YIN *et al.* (2002) utilizando o método do poder redutor, verificaram que os compostos organosulfurados dialil sulfito, dialil disulfito, S-etil cisteína (SEC) e N-acetil cisteína (NAC), quando comparados com o  $\alpha$ -tocoferol, apresentaram resultados diferentes. O SEC e o NAC apresentaram menor poder redutor do que o  $\alpha$ -tocoferol, ou seja, menor atividade antioxidante, porém o contrário ocorreu com os compostos dialil sulfito (DAS), dialil dissulfito (DADS).

De acordo com HOLUB *et al.* (2002) o extrato de alho envelhecido (AGE) é rico no composto organosulfurado, S-alicisteína (SAC), derivado da substância  $\gamma$ -glutamilcisteína, que possui propriedades antioxidantes. Para obter este produto, o alho é incubado em 15 a 20 % de etanol/água por 18 a 20 meses, onde o odor é removido. Este extrato não contém sulfoxidos de cisteína e produtos derivados da transformação da alicina.

WETTASINGHE *et al.* (2002) verificaram em seu estudo que o extrato aquoso de alho inibiu a descoloração do  $\beta$ -caroteno em torno de 30 %.

NUUTILA *et al.* (2003) verificando a inibição da peroxidação lipídica em hepatócitos de ratos, concluíram que o alho húngariano, apresentou 25 % de inibição da oxidação lipídica, utilizando concentração de 1000 mg/mL.

BENKEBLIA (2004) verificou em seu estudo a capacidade que os extratos de *Allium* possuem em remover o peróxido de hidrogênio. O autor concluiu que o alho removeu cerca de 91% dos peróxidos de hidrogênio, e as cebolas verde, amarela, vermelha e roxa removeram 35,9, 64,8, 76 e 77%, respectivamente.

TSAI *et al.* (2005) observaram que o alho possui 10,2 mg/g de equivalentes de ácido gálico (EAG) baseando no resíduo, e apresentou capacidade antioxidante total de 4,4 mmol de equivalentes de trolox/g de resíduo.

Além dos compostos organosulfurados, o alho possui outras substâncias com efeito antioxidante, ou seja, os compostos fenólicos, como os flavonóides (EGEN *et al.* 1992; BOREX 2001).

Os compostos fenólicos estão largamente distribuídos nos alimentos, sendo a quantidade presente na alimentação humana bastante significativa (DREOSTI 2000). Eles podem ser definidos quimicamente como substâncias que possuem um anel aromático ou um anel benzeno com uma ou mais hidroxilas; porém, podem

apresentar outros grupos substituintes em sua estrutura, como ésteres, metil-ésteres e glicosídeos (MARTINEZ-VALVERDE *et al.* 2000).

O mais importante grupo dos fenólicos em alimentos é o dos flavonóides, que consiste principalmente nos seguintes compostos:

- catequinas, presentes em frutas e folhas de chá;
- flavonóides e seus glicosídios, como a quercitina, miricetina e rutina presentes em frutas e outros vegetais (PRATT 1992).
- outros grupos são: (a) fenóis, ácidos fenólicos e ácidos fenil acéticos; (b) ácidos cinâmicos, cumarinas, isocumarinas e cromonóis; (c) lignanos e neolignanos; (d) taninos.

Além da capacidade antioxidante como bloqueadores dos radicais livres na reação em cadeia, os compostos fenólicos são capazes de eliminar os radicais hidroxila, o superóxido e o oxigênio singlete (DONNELLY e ROBSON 1995). A inativação de radicais de oxigênio por compostos fenólicos ocorre pela formação de espécies de menor reatividade, ou pela ação como doador de hidrogênio (SIMIC e JAVANOVIC 1994). A menor reatividade ocorre devido ao deslocamento do elétron não pareado para a estrutura do anel aromático (HALLIWELL e GUTTERIDGE 1989). Os compostos fenólicos também podem quelar metais (MOREIRA e MANCINI-FILHO 2004).

Como o alho é uma especiaria rica em substâncias com propriedades antioxidantes, então, existe a necessidade de compreender a definição, os mecanismos de ação, as fontes e a legislação dos antioxidantes; além dos métodos que podem ser utilizados para avaliar a propriedade antioxidante.

## **1.2. Antioxidantes: definição, mecanismos de ação, fontes e legislação**

Antioxidante se refere a qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável, atrasa ou inibe consideravelmente a oxidação do substrato (THOMAS 2000). Do ponto de vista biológico, podemos conceituar antioxidantes como substâncias que protegem sistemas biológicos contra

os efeitos potencialmente danosos de processos ou reações que promovem a oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares (ABDALLA 1993).

Os sistemas de defesa antioxidante do organismo humano compreendem uma gama variada de substâncias que atuam em diferentes níveis (SHAHIDI e WANASUNDARA 1992; ABDALLA 2000):

- sistema primário: constitui-se em uma primeira linha de defesa formada por substâncias que atuam impedindo a geração de espécies reativas, através da retirada das mesmas, de forma a impedir sua interação com alvos celulares, ou seja, bloqueiam a etapa de iniciação da cadeia radicalar. Entre os compostos que exercem este mecanismo de ação estão as enzimas antioxidantes (catalase, peróxido dismutase, glutathione peroxidase); quelantes de metais e proteínas, como a transferrina e a ceruloplasmina (transportam ferro e cobre respectivamente, impedindo que estes metais sejam liberados, e catalisam a formação de espécies oxidantes); substâncias não-enzimáticas (urato, ascorbato, alubina, bilirrubina, tocoferóis, carotenóides e bioflavonóides, que sequestram radicais superóxido e hidroxila ou suprimem oxigênio singlete);

- sistema de defesa secundário: é formado por compostos que atuam bloqueando a etapa de propagação da oxidação lipídica, sequestrando radicais intermediários (peroxil ou alcóxil). Esses antioxidantes geralmente são compostos fenólicos ou aminas aromáticas, entre eles estão o  $\alpha$ -tocoferol, flavonóides e vários antioxidantes sintéticos;

- sistema de defesa terciário: é constituído pelos sistemas de reparo do DNA: proteases e fosfolipases, as quais atuam removendo lesões oxidativas do DNA, proteínas e lipídios, respectivamente.

Os antioxidantes podem ser encontrados de duas formas nos alimentos: adicionados por processamento tecnológico ou como constituinte natural.

Os principais antioxidantes sintéticos utilizados habitualmente nos alimentos são os compostos fenólicos (BHA – butil hidroxianisol, BHT – butil hidroxitolueno, TBHQ – tercibutilhidroquinona, PG – galato de propila, NDGA – ácido nordihidroguaiarético (NAWAR 1996). O BHA, o BHT e o PG possuem alta estabilidade e baixo custo. No entanto, a utilização destes compostos em alimentos têm decrescido. Segundo MARTIN e GILBERT (1968) e HALLADAY *et al.* (1980)

os antioxidantes BHA e BHT podem apresentar certa toxicidade e eficiência menor em relação a alguns antioxidantes naturais. Estes compostos causaram hepatomegalia e alterações na atividade das enzimas do fígado e do intestino de ratos. Estes antioxidantes são largamente empregados pela indústria alimentícia em óleos, gorduras, salgadinhos e produtos cárneos (FERRARI 2000).

Os derivados do tocoferol e do ácido ascórbico, utilizados como substitutos dos antioxidantes sintéticos, são menos efetivos como antioxidantes de alimentos, necessitando a identificação de novas fontes naturais alternativas de antioxidantes em alimentos, junto com uma maior conscientização dos consumidores com relação à segurança dos aditivos nos alimentos (SHAHIDI e WANASUNDARA 1992).

Nos Estados Unidos a regulamentação para o emprego dos antioxidantes alimentares em alimentos é controlado pelas instituições: Federal Food, Drug, Cosmetic Act, Meat Inspection Act, Poultry Inspection Act e várias leis estaduais. Em geral, a maior parte dos países tem regulamentado a utilização isolada ou combinada dos antioxidantes sintéticos em quantidades não superiores a 200 ppm. No Brasil, esta regulamentação é controlada pela Resolução do Conselho Nacional de Vigilância Sanitária (CNS) nº 04/88, de 24 de novembro de 1988, publicada no Diário Oficial da União de 19/12/1988. No quadro 5 estão relacionados os aditivos classificados como antioxidantes e os limites máximos de segurança permitidos para o uso.

Quadro 5 - Limite máximo de uso de aditivos em alimentos no Brasil.

| Aditivos   | Alimentos em que podem ser usados | Limite máximo g/100 g - g/100 mL |
|--|-----------------------------------|----------------------------------|
| <b>Ácido ascórbico (ácido L-ascórbico e seus sais de potássio, sódio e cálcio)</b> | Margarina                         | 0,30                             |
|  | Óleos e gorduras                  | 0,03                             |
| <b>Ácido cítrico</b>   | Margarinas                        | q.s.p.*                          |
|  | Óleos e gorduras                  | q.s.p.*                          |
| <b>Ácido isoascórbico e seu sal de sódio</b>                                       | Margarinas                        | 0,20                             |
|  | Óleos e gorduras                  | 0,03                             |
| <b>Ácido fosfórico</b>   | Margarinas                        | 0,01                             |
|  | Gorduras e compostos gordurosos   | 0,01                             |
| <b>Butil hidroxianisol (BHA)</b>   | Margarinas                        | 0,02                             |
|  | Óleos e gorduras                  | 0,02                             |

continuação...

...continuação

| Aditivos  | Alimentos em que podem ser usados                   | Limite máximo g/100 g - g/100 mL |
|---|---|----------------------------------|
| <b>Butil hidroxitolueno (BHT)</b>   | Margarinas  | 0,02                             |
|   | Óleos e gorduras                                    | 0,01                             |
| <b>Citrato de monoglicerídeos</b>   | Margarinas  | 0,01                             |
|   | Óleos e gorduras                                    | 0,02                             |
| <b>Citrato de monoisopropila</b>  | Margarinas  | 0,01                             |
|   | Óleos e gorduras                                    | 0,01                             |
| <b>EDTA - cálcico dissódico (etilenodiaminotetracetato cálcico e dissódico)</b> | Gorduras e compostos gordurosos                     | 0,01                             |
|   | Margarinas  | 0,01                             |
| <b>Eritorbato de sódio</b>  | Carnes, produtos frescos embutidos ou não embutidos | q.s.p*                           |
| <b>Galato de proprila de duodecila ou de octil</b>                              | Margarinas  | 0,01                             |
|   | Óleos e gorduras                                    | 0,01                             |
| <b>Lecitinas (fosfolípidos, fosfatídeos e fosfoluteínas)</b>                    | Margarinas  | 0,50                             |
|   | Óleos e gorduras                                    | 0,20                             |
| <b>Palmitato de ascorbila e estearato de ascorbila</b>                          | Margarinas  | 0,02                             |
|   | Óleos e gorduras                                    | 0,05                             |
| <b>Tercibutilhidroquinona (TBHQ)</b>  | Óleos e gorduras                                    | 0,02                             |
| <b>Tocoferóis</b>   | Margarinas  | 0,03                             |
|   | Óleos e gorduras                                    | 0,03                             |

\* q.s.q = quantidade suficiente para

Fonte: Diário Oficial da União de 19/12/1988

O interesse pela pesquisa sobre novos antioxidantes naturais tem aumentado nos últimos anos, levando as indústrias de alimentos, de cosméticos e farmacêuticos a ter maior atenção em novas fontes de antioxidantes naturais. Os compostos antioxidantes naturais têm sido isolados de diferentes partes de plantas, tais como sementes, frutas, folhas e raízes; e nas especiarias. Os mais utilizados em alimentos são o ácido cítrico, ácido ascórbico e palmitato de ascorbila (DORKO 1994).

Segundo WANASUNDARA *et al.* (1997) muitos são os componentes naturalmente presentes nos alimentos que apresentam atividade antioxidante, os quais incluem: carotenóides ( $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno, luteína, licopeno); compostos fenólicos (ácido clorogênico, cumarinas, ácidos fenólicos, lignanas, flavonóides, tirosol, antocianinas, taninos, catequina); compostos organosulfurados e tocoferol, sendo que no alho estão presentes os compostos fenólicos e organosulfurados.

Sendo uma das características dos antioxidantes retardar o desenvolvimento de sabor e aroma desagradável ocasionado pela oxidação de ácidos graxos insaturados, usualmente presentes, como triacilgliceróis, hoje em dia há uma

tendência geral no processamento de alimentos em substituir os antioxidantes sintéticos pelos inibidores naturais da oxidação, ou seja, pelo uso de ingredientes alimentares que naturalmente possuem atividade antioxidante (MANCINI-FILHO *et al.* 1998).

### **1.2.1. Estudos com alimentos funcionais – ação antioxidante**

Declarações sobre a capacidade de certos alimentos em reduzir o risco de doenças e melhorar a qualidade de vida continuam levantando opiniões em pesquisas de nutrição e na indústria de alimentos. O interesse da população por “alimentos funcionais” e seus componentes fisiologicamente ativos se deve a estes estarem relacionados com a redução dos custos com cuidados médicos e à promoção à saúde (MILNER 1999).

PARRAS e DUAILIBI (2002) relataram que os alimentos funcionais são alimentos naturais ou produtos alimentícios elaborados que possuem em sua composição substâncias bioativas que podem influenciar positivamente numa função fisiológica atuando na redução de riscos de várias doenças. A regulamentação do conceito de alimentos funcionais têm sido examinada baseada em parâmetros internacionais, e é geralmente aceito que estes alimentos devem fornecer benefícios à saúde, além de seus valores nutricionais (KWAK e JUKES 2001).

O efeito das substâncias alimentares bioativas na manutenção da saúde e na proteção contra doenças, como as cardiovasculares e câncer, além da atenuação do envelhecimento, tem aumentado o interesse no sentido de ampliar o conhecimento sobre as mesmas, entre os pesquisadores, fabricantes de alimentos e consumidores (LOLIGER 1991). Alguns estudos para avaliar a atividade antioxidante que os alimentos e bebidas apresentam estão citados abaixo:

MELO *et al.* (1986), quando avaliaram 20 tipos de temperos, observaram uma alta capacidade antioxidante para extratos obtidos do alecrim, da sálvia, do orégano, do cravo, da mostarda, e em menor intensidade para salsa e cebolinha, embora todos os extratos foram efetivos como antioxidantes.

FERRARI (2002) analisou a capacidade antioxidante de alimentos *in natura* e manufaturados consumidos no município de São Paulo, e concluiu que os alimentos que apresentaram elevada atividade antioxidante foram a castanha do Brasil, seguidos do guaraná, café, chocolate, maçã, couve manteiga e beterraba, já os menores valores encontrados foram para o feijão, a banana, a cebola, o limão e a laranja.

ISHIMOTO (2003) avaliou a atividade antioxidante de diferentes tipos e marcas de vinhos e sucos de uva brasileiros, e concluiu que os sucos de uva apresentaram valores de inibição da oxidação lipídica inferiores aos encontrados para os vinhos tintos. Comparando os vinhos, o tinto apresentou melhor inibição da oxidação que o rosé e este por sua vez, melhor que o branco. A atividade antioxidante dos vinhos e dos sucos está relacionada ao teor de compostos fenólicos presentes nestas bebidas.

MELO *et al.* (2003) quando avaliaram a atividade antioxidante de extratos de coentro (extrato etéreo, etanólico e aquoso), isolados, associados entre si e com o BHT, utilizando o sistema modelo  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico, verificaram que os extratos aquoso, etéreo e etanólico exibiram 69,83%, 61,89% e 40,50%, respectivamente, de proteção contra a oxidação. Ao combinar os dois primeiros extratos, em diferentes concentrações, o percentual de inibição da oxidação foi inferior ao dos extratos isolados, demonstrando não haver sinergismo entre eles. Associações de diferentes concentrações de BHT com o extrato aquoso exibiram elevada ação antioxidante, enquanto com o extrato etéreo esta ação foi levemente superior a do extrato isolado. A habilidade dos extratos aquoso e etéreo em retardar a oxidação pode ser atribuída, respectivamente, aos seus constituintes fenólicos e carotenóides.

SALDANHA (2005) estudando a atividade antioxidante *in vitro* das diferentes concentrações e extratos de erva-mate verde e tostada e chá verde, concluiu que, pelo sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico, apenas os extratos aquosos e etéreos de chá verde, na concentração de 0,5 mg/mL, apresentaram resultados inferiores ao BHT (padrão), sendo que os demais, para ambas as concentrações (0,5 e 1,0 mg/mL) apresentaram ótima inibição da oxidação lipídica (semelhante ao padrão).

BASTOS *et al.* (in press) avaliaram a atividade antioxidante do chá verde e do chá mate pelo método do Tiocianato Férrico, e concluíram que as amostras possuem capacidade antioxidante similar ao padrão BHT (antioxidante sintético).

Embora seja crescente o interesse para o uso de fontes naturais com potencial antioxidante, apenas um número limitado delas é realmente utilizado em alimentos (LOLIGER 1991).

### 1.2.2. Métodos para determinar a atividade antioxidante em alimentos

A determinação da atividade antioxidante em alimentos torna-se cada vez mais importante nas áreas de tecnologia dos alimentos e de nutrição. Embora exista uma grande diversidade de métodos, não existem métodos validados ou padronizados (GIADA e MANCINI-FILHO 2004). Esta grande gama de metodologias empregadas proporciona resultados numéricos distintos, difíceis de serem comparados (GRAY 1978; MARTÍNEZ-VALVERDE *et al.* 2000).

A maior parte dos métodos para avaliação da atividade antioxidante *in vitro* é baseada na capacidade destes em remover os radicais livres do meio, pela rápida doação de um átomo de hidrogênio para estes radicais (PRIOR e CAO 2000). Para se determinar a atividade antioxidante pode ser utilizado o método radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH<sup>•</sup>), o ensaio do poder antioxidante em redução férrica (FRAP), o método de descoloração do radical 2,2'-azinobis-ABTS<sup>•+</sup>, o ensaio da capacidade de absorvância do radical oxigênio (ORAC), o com metassulfato-NADH fenazina e o ensaio da atividade da xantina-oxidase (MOURE *et al.* 2001).

Também existem os métodos que empregam lipídios como substrato. Neste grupo de metodologias, há uma grande diversidade de métodos analíticos (químicos, físicos e/ou físico-químicos). A existência de vários métodos para avaliar a capacidade antioxidante, gera algumas dificuldades de seleção da metodologia mais adequada para um determinado estudo. Da mesma forma, a diversidade das condições de ensaio (substratos lipídicos, concentrações, tempo de oxidação, temperaturas, oxigenação), e dos sistemas modelos usados dificulta à interpretação e comparação dos resultados obtidos através destas metodologias. O sistema  $\beta$ -

caroteno/ácido linoléico, o aparelho Rancimat®, método de dienos conjugados, ensaio das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), índice de peróxidos, LDL-colesterol humana são utilizados para a avaliação da atividade antioxidante (SILVA *et al.* 1999; GIADA e MANCINI-FILHO 2004).

Desta forma, a atividade antioxidante *in vitro* pode e deve ser avaliada por testes com diferentes mecanismos. Contudo, todos estes diversos ensaios baseados em reações químicas oferecem resultados diferentes. No capítulo a seguir, foram escolhidos três métodos com mecanismos diferentes para avaliar a atividade antioxidante do alho *in natura* e de seus produtos comercializados, sendo eles o ensaio DPPH, o sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico e avaliação da capacidade protetora da oxidação lipídica utilizando o aparelho Rancimat®, que estão descritos abaixo. A escolha destes métodos se deve a grande utilização dos mesmos em outros estudos (KAUR e KAPOOR 2002; NUUTILA *et al.* 2003; BENKEBLIA 2005; SUN e HO 2005), permitindo assim uma comparação de resultados.

- Ensaio radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH): este método baseia-se na remoção do radical estável DPPH $\cdot$  do meio de reação pelos antioxidantes da amostra (PULIDO *et al.* 2000). O radical DPPH $\cdot$  foi um dos mais antigos radicais sintéticos usados para se estudar os efeitos estruturais na atividade antioxidante. Este radical comercialmente disponível serve como radical oxidável a ser reduzido pelo antioxidante (AH), bem como indicador para a reação:  $\text{DPPH}\cdot + \text{AH} \rightarrow \text{DPPH-H} + \text{A}\cdot$  (YAMAGUCHI *et al.* 1998; GIADA e MANCINI-FILHO 2004). O grau de descoloração do radical DPPH $\cdot$ , a 517 nm, pela ação dos antioxidantes é medido espectrofotometricamente em uma solução metanólica até a absorbância permanecer constante, e indica a eficiência de remoção do radical pelo antioxidante adicionado (GIADA e MANCINI-FILHO 2004).

- Sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico: este método consiste na co-oxidação de substratos, através de ensaio espectrofotométrico a 450 a 470 nm, baseado na descoloração (oxidação) do  $\beta$ -caroteno, induzido por produtos da degradação do ácido linoléico devido a diferentes indutores (oxigênio, luz, calor) (MARCO 1968; modificado por MILLER 1971). A queda na leitura da densidade ótica das amostras

é correlacionada com o controle (sem antioxidante), considerado como 100% de oxidação, e estabelecida a percentagem de inibição da oxidação, subtraindo-se a percentagem de oxidação de cada amostra de 100 (MELO e MANCINI-FILHO 1989).

- Avaliação da capacidade protetora da oxidação lipídica utilizando o aparelho Rancimat®: este procedimento requer equipamento simples e pode ser utilizado como um método para determinar a atividade antioxidante, através de diversos substratos como a gordura vegetal hidrogenada e os óleos comestíveis. O lipídio é exposto a uma corrente de ar seco ou de oxigênio, a uma temperatura de 100 a 140 °C, e o progresso das curvas de oxidação decorrente pode ser seguido pela determinação periódica do índice de peróxido. Estas curvas compreendem uma fase de indução, onde não se forma praticamente nenhum dos produtos secundários da oxidação, e uma fase de oxidação, durante a qual há uma grande elevação no índice de peróxido, e produtos voláteis (principalmente ácido fórmico) são detectados. A adição de um antioxidante resulta na inibição da oxidação. O método empregado neste aparelho baseia-se no registro das variações da condutividade da água destilada, na qual se faz a coleta dos ácidos de baixo peso molecular obtidos após a iniciação forçada da oxidação à elevada temperatura (LAUBLI e BRUTTEI 1996; ANTOLOVICH *et al.* 2002).

Para melhor compreensão o que é uma substância antioxidante e como esta age, é necessário conhecer sobre os radicais livres, oxidação lipídica e estresse oxidativo.

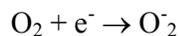
### **1.3. Radicais livres**

O interesse pelo estudo dos radicais livres e por substâncias antioxidantes têm se intensificado cada vez mais. O termo radical livre refere-se ao átomo ou molécula que contém número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica. Nas moléculas, os elétrons em geral se reúnem em pares. Um par de elétrons é mais

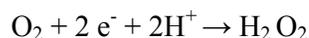
estável que quando desemparelhados. A falta de elétron com spin positivo ou negativo confere alta reatividade às moléculas, provocando reações em cadeia e desestabilizando as ligações das substâncias do meio molecular (FERREIRA e MATSUBARA 1997; THOMAS 2000). Eles são formados em um cenário de reações de óxido-redução, isto é, ou cedem o elétron, oxidando-se, ou recebem, reduzindo-se. Portanto, os radicais livres ou provocam as reações de óxido-redução ou resultam delas (FERREIRA e MATSUBARA 1997).

A maior parte dos radicais livres é derivada do metabolismo do oxigênio molecular ( $O_2$ ) utilizado na cadeia respiratória, que se encontra na membrana interna da mitocôndria para a produção de energia (ATP), sendo portanto, chamados de “espécies reativas do metabolismo do oxigênio” (ERO), e os principais são:

**(1)** radical superóxido ( $O_2^-$ ) – a adição de um elétron na molécula de  $O_2$  em seu estado fundamental ocorre em um de seus orbitais. A formação do radical superóxido com apenas um elétron não pareado pode gerar outras espécies de maior reatividade como o peróxido de hidrogênio, hidroxila e o peroxinitrito (HALLIWELL e GUTTERIDGE 1989).

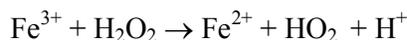


**(2)** peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) – resultante da redução com 2 elétrons do  $O_2$ , ( $O_2^{2-}$ ):



O  $H_2O_2$  não apresenta a característica de radical livre, pois em seus orbitais os elétrons estão pareados (HALLIWELL e GUTTERIDGE 1989). Esta espécie torna-se importante devido à sua característica hidrossolúvel, permitindo sua permeabilidade através de membranas biológicas, e também devido à produção de outros radicais de maior reatividade, como o radical hidroxila (HALLIWELL e GUTTERIDGE 1989; FERREIRA e MATSUBARA 1997).

(3) radical hidroxila ( $\text{OH}^\cdot$ ) – sua formação *in vivo* pode estar relacionada com a decomposição do peroxinitrito, do peróxido de hidrogênio ou superóxido, e com a presença ou não da ação catalítica de metais de transição (ferro), conhecidas como reações de Fenton e Haber-Weiss, conforme esquema abaixo:



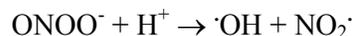
Esse radical é o de maior reatividade entre as espécies de oxigênio, e reage rapidamente com inúmeras biomoléculas, danificando-as (HALLIWELL e GUTTERIDGE 1989).

(4) oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ): é a forma excitada do oxigênio molecular e não possui elétrons desemparelhados em sua última camada. O  $^1\text{O}_2$  possui uma alta reatividade, sendo um poderoso agente oxidante. Tem importância em certos eventos biológicos, mas poucas doenças foram relacionadas à sua presença (FERREIRA e MATSUBARA 1997).

Também existe as “espécies reativas do metabolismo de nitrogênio” (ERN), como o óxido nítrico e peroxinitrito:

(1) óxido nítrico ( $\text{NO}$ ): é gerado *in vivo* a partir do aminoácido arginina, possui um potencial tóxico e está relacionado à formação de outras espécies altamente reativas, como o radical hidroxila e o peroxinitrito (HALLIWELL *et al.* 1995).

(2) peroxinitrito ( $\text{ONOO}^\cdot$ ): este sofre protonação em pH fisiológico e pode se decompor, gerando radical hidroxila e dióxido de nitrogênio em uma quebra homolítica dessa molécula, conforme esquema abaixo (HOOG *et al.* 1992):



O peroxinitrito é também uma espécie potencialmente tóxica, agindo diretamente sobre moléculas biológicas (RADI *et al.* 1991), podendo ser encontrado

na fumaça gerada pela queima do cigarro e de materiais orgânicos (HALLIWELL *et al.* 1995).

As ERO possuem um papel importante nos danos teciduais em humanos, desencadeando o processo de envelhecimento e na patogênese de mais de 50 doenças crônicas não transmissíveis como: aterosclerose, diabetes, câncer, Doença de Parkinson, Doença de Alzheimer. A reação de ERO com biomoléculas tais como lipídeos de membranas, proteínas e ácido desoxiribonucléico (DNA), pode provocar mudanças irreversíveis nas suas estruturas (IULIANO *et al.* 1997; ABDALLA 2000).

Vale ressaltar que nem sempre as ERO e as ERN estão envolvidas com processos biológicos indesejáveis. Por exemplo, o ânion superóxido possui um papel importante no combate de infecções provocadas por bactérias, auxiliando os neutrófilos na destruição dos microorganismos. Outro exemplo é a contribuição do óxido nítrico no controle da pressão e fluxo sanguíneo do sistema cardiovascular (BAST *et al.* 1991; MONCANDA e HIGGS 1993).

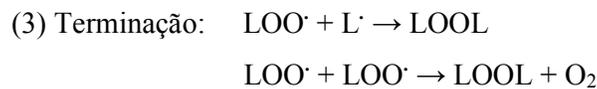
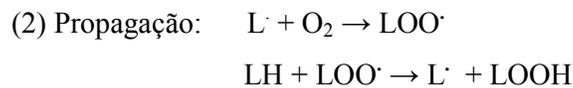
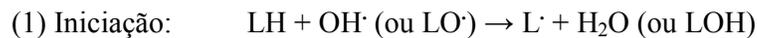
#### **1.4. Oxidação lipídica**

Todos os componentes celulares encontram-se propensos ao ataque dos radicais livres, mas a membrana, que é rica em lipídeos insaturados, é uma das mais atingidas (NAWAR 1996; FERREIRA e MATSUBARA 1997); conseqüentemente, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomos, e formação de produtos citotóxicos (como o malonaldeído), culminando com a morte celular. As lesões causadas pelo processo oxidativo *in vivo* induzidas por radicais livres podem estar associadas a várias condições clínicas, como lesões das fibras cardíacas, iniciação e progressão da carcinogênese, inflamações crônicas, diabetes, doenças auto-imunes e relacionadas ao próprio processo de envelhecimento (TORRES *et al.* 1988; ABDALLA 2000; CHENG *et al.* 2001; POLIDORI *et al.* 2001; CAMOUGRANG e RIGOULET 2001).

A oxidação lipídica ocorre também em alimentos. Este aspecto é de grande importância, não somente sob o enfoque econômico, devido a perdas por diminuição

da vida de prateleira, mas também pela possibilidade dos radicais livres formados reagirem ou interagirem com outros constituintes dos alimentos provocando uma queda na qualidade nutricional dos mesmos (NAWAR 1996).

A oxidação lipídica é uma reação em cadeia iniciada freqüentemente pelo radical hidroxila ( $\text{OH}^\cdot$ ), representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação. Estas etapas estão apresentadas nas reações seguintes, onde L representa o lipídio (NAWAR 1996; FERREIRA e MATSUBARA 1997):



(1) Ácidos graxos insaturados (LH) são convertidos, via abstração de hidrogênio (H) da membrana celular, em radicais livres lipídicos ( $\text{L}^\cdot$ ). Tal seqüestro pode ser realizado pelo  $\text{OH}^\cdot$  (radical hidroxila) ou pelo  $\text{LO}^\cdot$  (radical alcóxila).

(2) Os radicais livres gerados são oxidados pelo oxigênio molecular ( $\text{O}_2$ ), originando radicais peróxila ( $\text{LOO}^\cdot$ ), que por sua vez seqüestra novo hidrogênio do ácido graxo insaturado, formando novamente o  $\text{L}^\cdot$  (radical livre lipídico) na segunda equação da propagação.

(3) A fase de terminação tem como característica a formação de produtos finais estáveis ou não reativos (FERREIRA e MATSUBARA 1997).

Os principais produtos finais da oxidação lipídica compreendem os derivados da decomposição de hidroperóxidos, como álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres e outros hidrocarbonetos. O malonaldeído é o maior produto secundário da oxidação lipídica, apresentando efeito citotóxico, carcinogênico, mutagênico (FERRARI 1998).

Uma vez iniciada, a reação de oxidação lipídica segue em cadeia, e somente termina quando estiverem esgotadas as reservas de ácidos graxos insaturados e o oxigênio do meio (KIRK 1984, citado por FERRARI 2000).

Por esta razão, os fatores que desencadeiam, bem como os que previnem a oxidação lipídica são amplamente discutidos e documentados, sendo objeto de estudo nas últimas décadas (TORRES 1987; FERRARI e TORRES 2000).

### **1.5. Estresse oxidativo**

Os radicais livres podem ser gerados durante as funções metabólicas normais, porém as células, através de sistemas naturais de defesa constituídos principalmente pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), glutaciona peroxidase (GSH-Px), catalase e glutaciona reduzida (GSH), são protegidas. Entretanto, sob condições em que há excesso de radicais livres e deficiência no sistema protetor, haverá um desequilíbrio entre a formação e a remoção destas espécies reativas no organismo, caracterizando o estresse oxidativo (FERREIRA e MATSUBARA 1997; SIES 2000).

Uma maneira de combater o estresse oxidativo e a oxidação lipídica consiste na utilização de antioxidantes presentes em alimentos com a propriedade de impedir ou diminuir o desencadeamento das reações oxidativas (HALLIWELL *et al.* 1995).

Como o alho é uma especiaria rica em substâncias antioxidantes, justifica-se a avaliação de sua atividade antioxidante e de seus diferentes produtos comercializados mediante a vida de prateleira em próximos estudos.

## CAPÍTULO 2

### **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DE ALHO *IN NATURA* E DE SEUS PRODUTOS COMERCIALIZADOS DURANTE A VIDA DE PRATELEIRA**

#### **2.1. Introdução**

O aumento do consumo de frutas, vegetais e hortaliças está associado com o menor risco de doenças crônicas não transmissíveis, como alguns tipos de câncer, doenças cardiovasculares, e também na atenuação do processo de envelhecimento (LOLIGER 1991; VINSON *et al.* 1998; NUUTILA *et al.* 2003, SINGI *et al.* 2005). Este efeito protetor tem sido atribuído particularmente à presença de várias substâncias antioxidantes encontradas nestes alimentos, por exemplo a vitamina C e E,  $\beta$ -caroteno, polifenóis (NUUTILA *et al.* 2003).

O alho, conhecido cientificamente como *Allium sativum*, possui características acentuadas de aroma e sabor que lhe atribuem propriedades condimentares, conferindo a esta hortaliça destaque na culinária brasileira e também em outros países. Além desta forma de utilização, o alho tem sido utilizado muito na indústria farmacêutica, por possuir características de um alimento funcional (RIOS e PENTEADO 2003; SOUZA e MACEDO 2004). O consumo de produtos de alho processado (picado, frito, pasta) no Brasil vem crescendo gradativamente (OLIVEIRA *et al.* 2003; OLIVEIRA *et al.* 2004). Isto se justifica pela facilidade e praticidade de seu uso na culinária, sendo estes produtos encontrados prontos para o consumo.

Plantas da família *Allium* têm demonstrado propriedades antioxidantes em vários estudos (YIN e CHENG 1998; GAZZANI *et al.* 1998; NUUTILA *et al.* 2003; BENKEBLIA 2005; TSAI *et al.* 2005). Especialmente para o alho e seus diferentes extratos, observou-se que esta hortaliça possui atividade antioxidante em modelos *in*

*vitro*, e esta atividade é atribuída à variedade de compostos organosulfurados e seus precursores, além dos compostos fenólicos (KIM *et al.* 1997; NUUTILA *et al.* 2003).

De acordo com KIM *et al.* (1997), a alicina, dialil disulfeto e dialil trissulfeto são alguns dos compostos organosulfurados voláteis, presentes no alho, com atividade antioxidante. Testes com animais demonstraram que a alicina foi a responsável pela atividade antioxidante do alho quando utilizada em baixas concentrações (LAWSON 1998, citado por NUUTILA 2003). HIRATA e MATSUSHITA (1996) demonstraram que a allina, a precursora da alicina, não possui atividade antioxidante medida pelo sistema de oxidação do ácido linoléico.

A capacidade antioxidante das frutas e hortaliças depende da forma como o alimento é consumido, seja na forma *in natura* ou processado. KAUR e KAPOOR (2001) consideram que o tratamento térmico é a principal causa da alteração do teor de antioxidantes naturais em alimentos. O processamento e os procedimentos para a preservação dos alimentos podem ser responsáveis tanto pelo aumento quanto pelo decréscimo da atividade antioxidante, dependendo de muitos fatores, tais como: estrutura química, potencial de oxiredução, sua localização na matriz e possíveis interações com outros componentes do alimento (NICOLI *et al.* 1999).

O tratamento térmico, embora geralmente considerado como a principal causa da redução de antioxidantes naturais, pode também induzir a formação de novos compostos com propriedades antioxidantes, como os produtos da reação de Maillard (NICOLI *et al.* 1997; KAUR e KAPOOR 2001).

## **2.2. Justificativa**

A importância econômica da cultura do alho tem aumentado sensivelmente nos últimos anos, não só pelo seu uso generalizado como especiaria, mas também por algumas qualidades terapêuticas que a ele são atribuídas. O alho contém compostos fenólicos e organosulfurados, que são responsáveis pelo odor característico, sabor, aroma e ação antioxidante. A atividade antioxidante do alho *in natura* já foi demonstrada e está relacionada ao seu teor de compostos organosulfurados e de

compostos fenólicos, porém não há trabalho que compare a atividade antioxidante de extratos de diferentes produtos comercializados de alho.

## **2.3. Objetivos**

### **2.3.1. Objetivo Geral**

Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* do extrato metanólico do alho *in natura* e de seus diferentes produtos comercializados na cidade de São Paulo, verificando possíveis alterações durante a vida de prateleira.

### **2.3.2. Objetivos Específicos**

Os objetivos específicos irão responder as seguintes questões:

- Os resultados das análises da atividade antioxidante e do teor de fenólicos totais irão variar em função dos diferentes tipos de processamentos do alho?
- Houve modificações na atividade antioxidante e no teor de fenólicos totais no decorrer da vida de prateleira?
- Qual a correlação da atividade antioxidante avaliada por diferentes metodologias e do teor de fenólicos totais presentes nestes produtos?

Neste trabalho foi acrescentado, a nível de informação, o teor de umidade das amostras que encontram-se no anexo 1 (p. 120).

## **2.4. Materiais e Métodos**

### **2.4.1. Materiais**

#### **2.4.1.1. Solventes e reagentes**

Solventes e reagentes de grau analítico como: álcool etílico P.A., álcool metílico P.A., clorofórmio P.A., Tween 40, ácido gálico, ácido linoléico (W 33-800-1),  $\beta$ -caroteno (C 9750-5G), DPPH (D-9132), Folin- Ciocalteu e carbonato de sódio utilizados neste trabalho tiveram as seguintes procedências: CAAL Produtos Químicos Ltda, Sigma Aldrich Brasil Ltda, Merck S.A. produtos para laboratório Ltda, Synth- Labsynth produtos para laboratórios Ltda.

#### **2.4.1.2. Amostras**

O presente projeto foi desenvolvido com 3 lotes diferentes de uma mesma marca de alho. As amostras de alho *in natura* (3 caixas, contendo 5 kg cada) foram obtidas da Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais de São Paulo (CEAGESP). Segundo o comercializador de alho e informações do rótulo do produto, o local de plantio das amostras foi na região de Curitibanos – SC. O período de plantio foi julho de 2004 e a da colheita dezembro do mesmo ano, sendo que este produto chegou à CEAGESP em janeiro de 2005, quando o mesmo foi adquirido para o desenvolvimento do projeto.

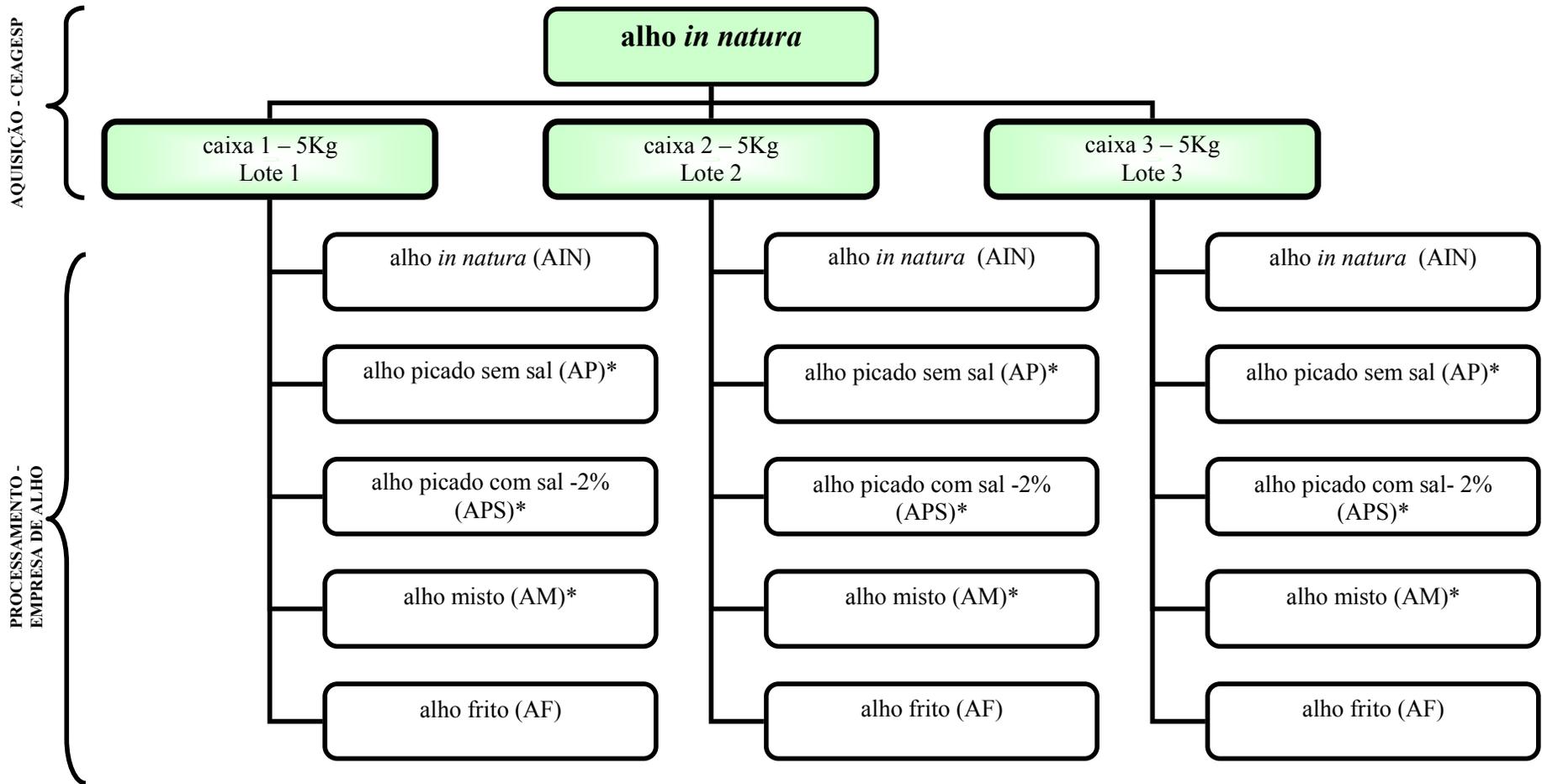
As amostras estavam armazenadas em caixas de madeira, e constava na embalagem a seguinte classificação do produto (de acordo com o número de dentes, cor e tamanho - maiores detalhes no quadro 3) :

grupo - nobre ;

subgrupo - 2;

classe - 7;

Posteriormente, estas amostras foram enviadas para a empresa Fresh Garlic, onde foram processadas, conforme descrito na figura 4. Esta empresa é de médio porte e está situada na cidade de São Paulo.



\* As amostras de alho picado sem sal, picado com sal (2%) e misto, contém em sua composição os seguintes aditivos: ácido cítrico, metabisulfito de sódio e benzoato de sódio. Já as amostras de alho *in natura* e frito não possuem aditivos.

Figura 4 – Esquema das amostras obtidas de alho.

Para avaliação da possível variabilidade da atividade antioxidante frente a vida de prateleira (determinada pelo fabricante), foram adquiridas 3 embalagens fechadas no mesmo momento de cada produto de alho e de cada lote, pois o processo analítico ocorreu em momentos diferentes, da seguinte forma (quadro 6):

**Momento 1** - análise próxima à data de fabricação;

**Momento 2** - análise no período intermediário entre a data de fabricação e a data de validade;

**Momento 3** - análise próxima ao fim da data de validade.

Todas as amostras foram armazenadas em temperatura ambiente, conforme indicação do fabricante.

Quadro 6 – Alho *in natura* e seus produtos comercializados, segundo a vida de prateleira e o momento das análises.

| Amostras                     | Vida de prateleira | Momento das análises |           |           |
|------------------------------|--------------------|----------------------|-----------|-----------|
|                              |                    | Momento 1*           | Momento 2 | Momento 3 |
| <b>Alho <i>in natura</i></b> | 2 meses            | 1 dia                | 30 dias   | 60 dias   |
| <b>Alho picado sem sal</b>   | 3 meses            | 1 dia                | 45 dias   | 90 dias   |
| <b>Alho picado com sal</b>   | 3 meses            | 1 dia                | 45 dias   | 90 dias   |
| <b>Alho misto</b>            | 3 meses            | 1 dia                | 45 dias   | 90 dias   |
| <b>Alho frito</b>            | 6 meses            | 1 dia                | 90 dias   | 180 dias  |

\* momento 1 = momento da aquisição, considerado o primeiro dia do processamento.

O alho *in natura* e os quatro produtos utilizados estão apresentados na figura 5.



*Alho in natura*



Alho Frito



Alho Misto



Alho Picado sem Sal



Alho Picado com Sal

Figura 5 – Alho *in natura* e seus produtos comercializados.

#### 2.4.1.2.1. Características das amostras

De acordo com as informações obtidas junto a empresa fornecedora das amostras, a retirada da película do alho *in natura* (AIN) para preparar o alho picado sem sal (AP), o picado com sal (APS), o misto (AM) e o frito (AF), foi realizada em descascadeira elétrica, sob pressão de ar comprimido. Para cortar as amostras *in natura* foi utilizado processador industrial.

As características específicas do alho *in natura* e de seus produtos, estão apresentadas abaixo:

- Alho *in natura*: para a realização da extração, os bulbos (cabeça) de alho foram descascados manualmente e triturados em processador (marca Waring, Estados Unidos);
- Alho frito: o alho *in natura* foi frito na temperatura de 180 °C por 2 minutos. O óleo utilizado foi o de soja e a gordura vegetal hidrogenada, na proporção 1:1, procedimento padrão;
- Alho misto: este produto é uma mistura do *in natura* com o desidratado, na proporção 1:5, pois é mais viável economicamente, segundo a empresa fornecedora das amostras. O alho desidratado é proveniente da China - informações sobre a variedade botânica deste alho não foram disponibilizadas pela empresa fornecedora das amostras deste trabalho, pois a mesma não dispunha deste dado. A hidratação do mesmo é feito com água potável, na proporção 1:1;
- Alho picado com sal: alho *in natura* picado adicionado de 2 % de sal (m/m), sendo este um procedimento padrão;
- Alho picado sem sal: alho *in natura* picado.

Para cada 10 kg dos produtos de alho misto, picado com sal e picado sem sal foram utilizados 800 g de ácido cítrico, 15 g de metabisulfito de sódio e 6 g de benzoato de sódio como aditivos.

Os diferentes produtos de alho foram adquiridos em embalagens plásticas transparentes contendo 200 g, semelhantes aos comercializados nos estabelecimentos de alimentos, conforme ilustrado na figura 5.

### 2.4.1.2.2. Peso médio dos dentes de alho

Os dentes de alho de 2 bulbos, de cada lote, foram pesados. Na tabela 2, pode-se verificar o peso médio e a quantidade de dentes de alho, segundo o lote. O número de dentes de alho dos bulbos dos diferentes lotes variaram de 12 a 15, conforme apresentado na tabela 2. De acordo com a análise de variância, pode-se afirmar que não existe diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,874$ ) entre o peso médio dos dentes de alho dos 3 lotes.

Tabela 2- Número e peso médio (g) dos dentes de alho em dois bulbos de cada lote.

| <b>Peso dos dentes de alho (g)</b> |                |                |                |                |                |                |
|------------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| <b>Dentes de</b>                   | <b>Lote 1</b>  |                | <b>Lote 2</b>  |                | <b>Lote 3</b>  |                |
| <b>Alho</b>                        | <b>Bulbo 1</b> | <b>Bulbo 2</b> | <b>Bulbo 1</b> | <b>Bulbo 2</b> | <b>Bulbo 1</b> | <b>Bulbo 2</b> |
| 1                                  | 4,58           | 3,58           | 3,12           | 5,21           | 4,20           | 5,83           |
| 2                                  | 5,00           | 2,06           | 6,22           | 5,38           | 4,43           | 7,00           |
| 3                                  | 5,61           | 4,67           | 5,98           | 4,02           | 4,67           | 6,49           |
| 4                                  | 6,89           | 5,42           | 6,35           | 6,68           | 3,39           | 3,20           |
| 5                                  | 4,73           | 3,54           | 4,18           | 3,90           | 1,73           | 2,24           |
| 6                                  | 1,67           | 5,35           | 2,18           | 2,82           | 5,70           | 1,56           |
| 7                                  | 3,12           | 2,21           | 0,68           | 2,62           | 2,95           | 5,54           |
| 8                                  | 5,49           | 4,84           | 1,37           | 6,67           | 2,24           | 4,98           |
| 9                                  | 5,18           | 5,03           | 3,11           | 3,53           | 4,58           | 6,46           |
| 10                                 | 2,58           | 6,09           | 4,29           | 6,07           | 2,91           | 4,18           |
| 11                                 | 3,33           | 2,98           | 3,05           | 2,13           | 3,10           | 3,39           |
| 12                                 | 2,30           | 1,87           | 2,40           | 3,38           | 4,04           | 3,19           |
| 13                                 | 2,08           |                | 0,80           |                | 2,94           | 3,38           |
| 14                                 | 1,27           |                | 3,55           |                |                |                |
| 15                                 |                |                | 1,50           |                |                |                |
| <b>Peso médio (g)</b>              | <b>3,90</b>    |                | <b>3,75</b>    |                | <b>4,01</b>    |                |
| <b>Desvio padrão</b>               | <b>1,58</b>    |                | <b>1,81</b>    |                | <b>1,49</b>    |                |

## 2.4.2. Métodos

### 2.4.2.1. Obtenção do extrato metanólico

O processo de extração das substâncias presentes nos alimentos pode ocorrer de diversas maneiras, variando tanto o tipo de solvente, quanto a metodologia. Por isso, foram realizados pré-testes com o intuito de avaliar 3 metodologias diferentes para a obtenção dos extratos de alho e posteriormente, verificar qual seria a melhor extração para analisar a atividade antioxidante e quantificar os teores de fenólicos totais. O critério utilizado para escolher o melhor método e solvente foi aquele que apresentou o maior teor de fenólicos totais e o melhor resultado de atividade antioxidante. Segundo dados da literatura, o teor de fenólicos totais está diretamente relacionado a capacidade antioxidante, ou seja, quanto maior o teor de fenólicos totais, maior a atividade antioxidante (KAUR e KAPOOR 2002; NUUTILA *et al.* 2003).

A primeira metodologia testada foi a descrita por KAUR e KAPOOR (2002), que consiste em: pesar, homogeneizar e centrifugar a amostra a temperatura ambiente a 9800 rpm por 15 minutos, utilizando dois solventes diferentes, obtendo os extratos aquoso e etanólico 80%. A segunda foi utilizada por NUUTILA *et al.* (2003), onde foi feita extração com metanol em agitador magnético por 1 hora, seguida de ultrassonificação por 20 minutos e centrifugação a 3000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi reservado e o resíduo extraído novamente pelo mesmo processo. Os dois sobrenadantes foram agrupados, obtendo-se o extrato metanólico, levando o volume a 50 mL. As amostras também foram extraídas com água (extrato aquoso) pelo mesmo processo. A terceira metodologia foi descrita por NUUTILA *et al.* (2003), porém com modificações, ou seja, ao invés de centrifugar o extrato, este foi filtrado em papel filtro (marca Nalgon, diâmetro 12,5 cm e porosidade 3 micra), conforme descrito na figura 6.

Depois de realizado o pré-teste, optou-se por trabalhar com o método de extração 3 (NUUTILA *et al.* 2003, com modificações) e com o solvente metanol, pois foi o que apresentou o melhor resultado em teor de fenólicos totais (SINGLETON e ROSSI 1965, modificado por NUUTILA *et al.* 2003) e em atividade

antioxidante pelo ensaio radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), segundo método desenvolvido por YAMAGUCHI *et al.* 1998. Estes dois métodos são citados com maiores detalhes nos itens 2.4.2.3 e 2.4.2.4.1.

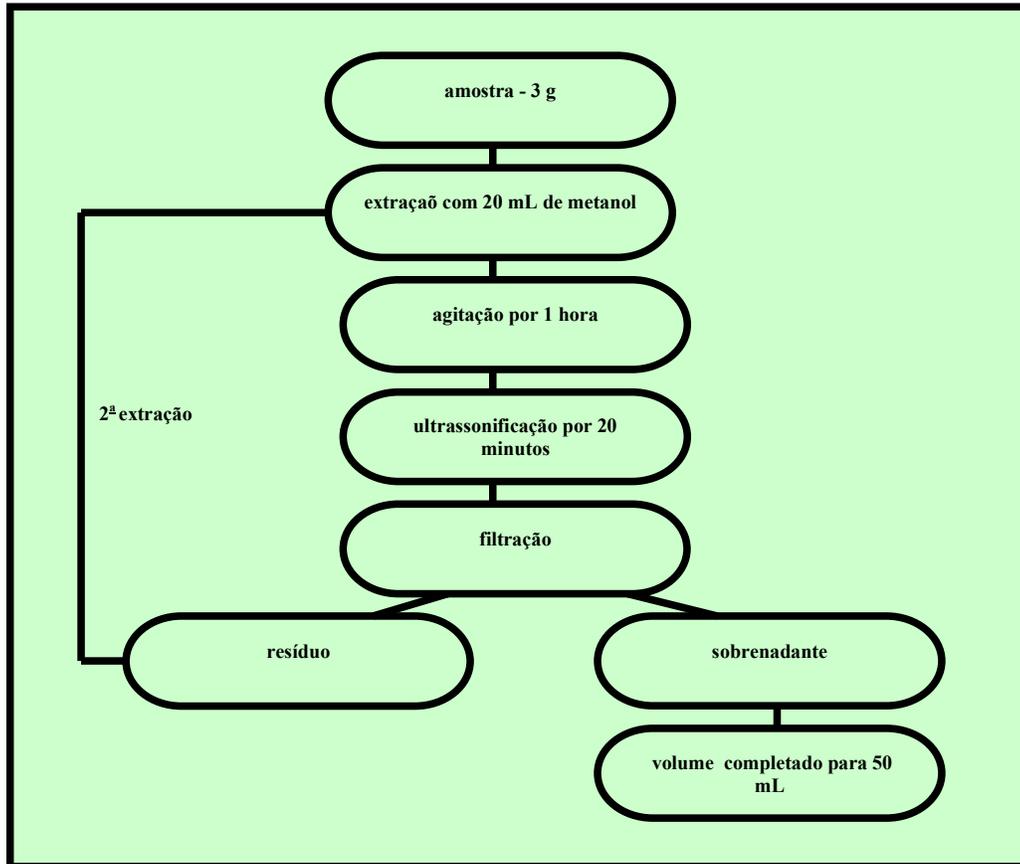


Figura 6 - Esquema da extração das diferentes amostras de alho, segundo NUUTILA *et al.* (2003), com modificações.

#### Descrição do método de extração

Conforme apresentado na figura 6, foram pesadas 3 g de amostra e adicionados 20 mL de metanol P.A, em seguida, a amostra foi agitada por 1 hora em agitador magnético (marca Quimis, modelo Q.261.2) e ultrassonificada (marca Thornton) por 20 minutos, sendo em seguida filtrada, utilizando papel filtro (marca Nalgon, diâmetro 12,5 cm e porosidade 3 micra). O sobrenadante foi armazenado em

balão volumétrico de 50 mL. O resíduo retido no filtro sofreu nova extração, sendo que o seu sobrenadante foi direcionado para o mesmo balão do anterior. Foram utilizados 10 mL de metanol para lavagem final do resíduo, sendo este descartado. Os sobrenadantes foram completados para o volume de 50 mL com metanol.

Os extratos foram colocados em frascos âmbar, sob atmosfera de nitrogênio e armazenados no freezer à -18 °C até o momento das análises.

#### **2.4.2.2. Determinação do teor de resíduo seco dos extratos**

A quantificação do resíduo seco das amostras foi determinada pelo método gravimétrico. O volume de 1 mL do extrato foi transferido para vidro relógio, previamente tarado, e este foi colocado em estufa à 105 °C, por 16 horas, seguido de resfriamento em dessecador e pesagem, sendo a operação repetida até peso constante, obtendo então o resíduo seco em mg/mL de extrato (AOAC 1995). A finalidade de determinar o resíduo seco se deve a padronização da concentração das diferentes amostras para avaliação da atividade antioxidante.

#### **2.4.2.3. Quantificação de compostos fenólicos**

A obtenção do teor de compostos fenólicos presentes nos diferentes produtos comercializados de alho foi realizada pelo método desenvolvido por SINGLETON e ROSSI (1965), modificado por NUUTILA *et al.* (2003), empregando-se o reagente de Folin-Ciocalteu. Este método colorimétrico baseia-se na redução dos ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico em solução alcalina, e é o mais utilizado para a determinação de compostos fenólicos totais em alimentos. A cor azul produzida pela redução do reagente Folin-Ciocalteu pelos fenólicos é medida espectrofotometricamente, na faixa de absorção de 735 nm. Em tubos de ensaio, foram adicionados 400 µL do extrato, 400 µL de metanol, 400 µL de Folin-Ciocalteu e 2000 µL da solução de carbonato de sódio (20 % m/v). A mistura foi homogeneizada em agitador de tubos, sendo adicionados mais 800 µL da solução de

carbonato de sódio (20 % m/v). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas (centrífuga marca ALC, modelo 4239R - Itália) por 3 minutos a 14000 rpm e mantidas em repouso por 20 minutos à temperatura ambiente. A leitura da absorbância foi mensurada em comprimento de onda de 735 nm, utilizando-se o espectrofotômetro UV-visível, marca Micronal, modelo B 542 – Brasil. O ácido gálico foi utilizado como padrão. O cálculo do teor de fenólicos foi realizado através da elaboração da curva padrão do ácido gálico em 6 concentrações diferentes (0,005 a 0,03 mg/mL), da qual se obteve a seguinte equação:

$$y = 13,2x + 0,0193 \quad (R^2 = 0,9999)$$

onde: y = valor da absorbância

x = teor de fenólicos totais

R<sup>2</sup> = coeficiente de determinação do modelo

Os resultados obtidos foram expressos em µg/mL ou µg/mg em relação ao resíduo seco, ambos os valores em equivalentes de ácido gálico (µg/mL/EAG ou µg/mg/EAG).

#### **2.4.2.4. Avaliação da atividade antioxidante**

##### **2.4.2.4.1. Ensaio radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)**

A capacidade das amostras em sequestrar radicais livres foi determinada através do ensaio DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil), descrito por YAMAGUCHI *et al.* (1998), com modificações. Os extratos e o BHT (antioxidante padrão) foram diluídos em metanol na concentração de 1 mg/mL. Uma alíquota de 1,5 mL da solução metanólica de DPPH na concentração de 20 mg/mL (preparado diariamente) foi acrescentada a 750 µL dos extratos das amostras. O decréscimo da absorbância a 517 nm foi monitorada em espectrofotômetro (marca Micronal, modelo B 542 – Brasil), em diferentes intervalos de tempo (0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 e 20 minutos).

Para se calcular a porcentagem da atividade antioxidante (AA) foi utilizado o valor de absorbância no tempo de 20 minutos na fórmula abaixo:

$$\% \text{ AA} = \frac{[(\text{abs. do branco do DPPH}) - (\text{abs. final da amostra} - \text{abs. do branco da amostra})]}{\text{abs. do branco do DPPH}}$$

onde: abs. = absorbância

Branco do DPPH = 750  $\mu$ L de metanol + 1,5 mL da solução de DPPH

Branco da amostra = 750  $\mu$ L da amostra + 1,5 mL de metanol

As leituras da absorbância dos brancos (amostras e DPPH) foram feitas imediatamente após o seu preparo.

#### **2.4.2.4.2. Sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoléico**

A determinação da atividade antioxidante pelo sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico foi realizada de acordo com a metodologia descrita por MARCO (1968) e modificada por MILLER (1971). Como substrato, foi utilizado a emulsão de  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico. Em 28  $\mu$ L da solução de  $\beta$ -caroteno (preparada na proporção de 20 mg de  $\beta$ -caroteno/mL de clorofórmio) foi adicionada 28  $\mu$ L de ácido linoléico e 200 mg de Tween 40 (emulsificante). Em seguida, o clorofórmio foi evaporado sob atmosfera de nitrogênio e acrescentado 140 mL de água oxigenada (água destilada tratada com oxigênio por 30 minutos). No tubo de ensaio, 5 mL desta solução foi adicionada a 1 mL dos extratos diluídos (1mg/mL). Após ser homogeneizado, a leitura foi feita em espectrofotômetro a 470 nm, sendo esta a leitura do tempo zero (tempo inicial). Os tubos foram então colocados em banha-maria (50°C) e as próximas leituras foram feitas a cada 15 minutos, até atingir o tempo de 2 horas. O padrão (BHT) foi preparado da mesma forma que as amostras, assim como o controle, porém para este no lugar da amostra foi adicionado 1 mL de metanol.

A oxidação do  $\beta$ -caroteno, obtida pelas medidas espectrofotométricas, indica a velocidade de transformação desse composto sob condições oxidantes (oxigênio e temperatura). Para o cálculo da porcentagem da inibição da oxidação lipídica (% IOL) foram utilizadas as seguintes fórmulas:

$$\mathbf{100\% \text{ da oxidação}} = \text{absorbância inicial do controle} - \text{absorbância final do controle}$$

Correlacionou-se a queda na leitura da absorbância das amostras com o controle e foi estabelecida a porcentagem de inibição da oxidação lipídica a partir da subtração da porcentagem da oxidação de cada amostra de 100, segundo a fórmula abaixo:

$$\mathbf{\% \text{ IOL}} = 100 - \frac{(\text{absorbância inicial da amostra} - \text{absorbância final da amostra}) \times 100}{\text{absorbância inicial do controle} - \text{absorbância final do controle}}$$

Todas as emulsões e soluções foram preparadas diariamente.

#### **2.4.2.4.3. Avaliação da capacidade protetora da oxidação lipídica utilizando o aparelho Rancimat®**

Para avaliar a capacidade protetora utilizou-se o aparelho Rancimat® 743, marca *Metrohm*, conectado ao programa PC: 743 Rancimat 1.0, onde foi medido o período de indução da gordura vegetal hidrogenada (marca Sadia) contendo o extrato metanólico. O volume do extrato foi previamente calculado com base no resíduo seco do mesmo para que a sua concentração no substrato (gordura vegetal hidrogenada) fosse de 1 mg/mL. O volume dos extratos foram colocados nos tubos do Rancimat® e evaporados sob atmosfera de nitrogênio. Em seguida,  $\pm$  3,00 g de gordura vegetal hidrogenada sem antioxidante foram adicionados em cada tubo e a

mistura homogeneizada por 15 minutos em ultrasonificador. Depois, com a programação de temperatura de 110°C,  $\Delta T = 1,5^\circ\text{C}$ , fluxo de ar de 20 L/h, os tubos foram acoplados ao aparelho Rancimat®, até que a curva de condutividade em relação ao tempo de indução (TI) fosse finalizada para se calcular o Índice de Atividade Antioxidante (IAA). Um controle foi também preparado com a gordura vegetal hidrogenada sem antioxidante. O BHT a 1,0 mg/mL foi utilizado como padrão.

Os resultados foram expressos como Índice de Atividade Antioxidante (IAA), calculado pela fórmula:

$$\text{IAA} = \frac{\text{TI amostra}}{\text{TI controle}}$$

Onde: TI amostra = tempo de indução (h) da gordura vegetal hidrogenada + extrato contendo a amostra.

TI controle = tempo de indução (h) da gordura vegetal hidrogenada sem o extrato.

#### 2.4.2.5. Análise Estatística

Os resultados das diferentes análises foram apresentados como média e desvio padrão.

Para comparar os resultados do alho *in natura* e de seus produtos comercializados foi realizada análise de variância (NETER *et al.* 1996), e o teste de *Tukey* para as comparações múltiplas. A mesma análise foi realizada para os diferentes momentos da vida de prateleira.

Para quantificar a relação linear entre os pares de variáveis numéricas, foi utilizada a correlação linear de *Pearson*.

Todas as análises foram realizadas em triplicata, com exceção do método utilizando o aparelho Rancimat, onde se utilizaram amostras em duplicata. O nível de significância estabelecido para todas os testes estatísticos aplicados foi de 5%, sendo

utilizado o "software" Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), versão 10.0 for Windows.

## **2.5. Resultados e Discussão**

### **2.5.1. Teor de fenólicos totais**

Além dos compostos organosulfurados que conferem atividade antioxidante ao alho, também há a presença dos compostos fenólicos nesta especiaria, dentre eles os flavonóides (quercitina, miricetina e caempferol) (BILYK e SAPERS 1985; LANZOTTI 2006). Sabe-se que os compostos fenólicos constituem um dos maiores grupos de compostos presentes em plantas, atuando como antioxidantes primários ou sequestradores de radicais livres (SINEIRO *et al.* 1989; SHAHIDI *et al.* 1992) em sistemas biológicos.

Desta forma, foi determinado o teor de fenólicos totais das amostras estudadas. Os resultados obtidos indicaram que o alho *in natura* e todos os seus produtos contêm fenólicos entre seus constituintes, um fator importante na avaliação da atividade antioxidante. Os teores encontrados dos três momentos encontram-se na tabela 3.

Tabela 3 – Teores médios e desvio padrão (dp) de resíduo seco e de fenólicos totais do alho *in natura* e de seus produtos comercializados dos momentos 1, 2 e 3 (n\* = 9).

| Alho                               | Resíduo Seco (mg/mL) |           |           | Fenólicos totais (µg/mL/EAG**) do extrato |                              |                              | Fenólicos totais (µg/mg/EAG**) do extrato em relação ao resíduo seco |                             |                             |
|------------------------------------|----------------------|-----------|-----------|---|------------------------------|------------------------------|--|-----------------------------|-----------------------------|
|                                    | Momento 1            | Momento 2 | Momento 3 | Momento 1                                 | Momento 2                    | Momento 3                    | Momento 1  | Momento 2                   | Momento 3                   |
| <b>Alho <i>in natura</i> (AIN)</b> | 2,90                 | 3,19      | 2,61      | 20,29 <sup>c</sup><br>(2,87)              | 23,06 <sup>d</sup><br>(2,13) | 22,70 <sup>d</sup><br>(4,06) | 6,99 <sup>b</sup><br>(0,39)  | 7,23 <sup>c</sup><br>(0,33) | 8,70 <sup>c</sup><br>(1,83) |
| <b>Alho frito (AF)</b>             | 1,49                 | 1,39      | 1,08      | 12,36 <sup>a</sup><br>(2,27)              | 9,81 <sup>a</sup><br>(0,63)  | 6,96 <sup>a</sup><br>(1,33)  | 8,32 <sup>c</sup><br>(1,32)  | 7,07 <sup>c</sup><br>(0,64) | 6,45 <sup>b</sup><br>(2,15) |
| <b>Alho picado sem sal (AP)</b>    | 3,74                 | 6,23      | 6,58      | 23,76 <sup>d</sup><br>(1,82)              | 18,39 <sup>c</sup><br>(0,97) | 16,77 <sup>c</sup><br>(1,77) | 6,36 <sup>b</sup><br>(0,54)  | 2,95 <sup>b</sup><br>(0,38) | 2,55 <sup>a</sup><br>(0,35) |
| <b>Alho picado com sal (APS)</b>   | 4,58                 | 7,85      | 8,09      | 21,91 <sup>c,d</sup><br>(1,57)            | 19,16 <sup>c</sup><br>(1,37) | 16,98 <sup>c</sup><br>(1,75) | 4,78 <sup>a</sup><br>(0,37)  | 2,44 <sup>a</sup><br>(0,17) | 2,10 <sup>a</sup><br>(0,19) |
| <b>Alho misto (AM)</b>             | 2,68                 | 4,45      | 4,90      | 16,64 <sup>b</sup><br>(3,73)              | 14,01 <sup>b</sup><br>(3,42) | 13,43 <sup>b</sup><br>(2,46) | 6,21 <sup>b</sup><br>(1,10)  | 3,15 <sup>b</sup><br>(0,65) | 2,74 <sup>a</sup><br>(0,47) |

\* n = número de amostras.

\*\* EAG = equivalentes de ácido gálico.

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significante (p < 0,05).

Os valores de compostos fenólicos totais do extrato metanólico do alho *in natura* e de seus produtos do **momento 1** (análise próxima à data de fabricação) variaram de 12,36 a 23,76 µg/mL/EAG (tabela 3). Os extratos de alho picado sem sal e com sal apresentaram maior teor de fenólicos, enquanto que o alho frito (AF) apresentou em média menor quantidade, quando comparado com os demais produtos ( $p < 0,001$ ). Com base nos resultados de fenólicos totais do extrato em relação ao resíduo seco, o AF foi o produto que apresentou maior quantidade destes compostos. Para as demais amostras, AIN, AP e AM não houve diferença estatisticamente significativa.

No **momento 2** (análise no período intermediário entre a fabricação e a validade), o alho *in natura* foi a amostra que apresentou maior teor de fenólicos totais e o frito menor teor. Não foi observado diferença entre o picado sem sal e o com sal ( $p = 0,920$ ). Em relação aos fenólicos totais, de acordo com o resíduo seco, o produto frito e o alho *in natura* foram as amostras que apresentaram o maior teor destes compostos.

Os resultados dos compostos fenólicos totais das análises próxima ao fim da data de validade (**momento 3**) também estão apresentados na tabela 3. Pela análise de variância, pode-se observar que existe diferença estatisticamente significativa entre as amostras. O extrato de alho *in natura* foi o que apresentou maior quantidade de fenólicos totais, enquanto que o frito apresentou o menor teor. Não foi observado diferença entre o picado sem sal e o com sal. Com base no resíduo seco, o extrato de alho *in natura* apresentou o maior teor médio destes compostos, seguido do produto frito.

Os maiores valores de fenólicos em relação ao resíduo seco não corresponderam necessariamente aos maiores teores de fenólicos totais nos extratos. Este fato também foi constatado por ISHIMOTO (2003) que pesquisou a atividade antioxidante *in vitro* em diferentes vinhos e sucos de uva. Isto se deve à diferença de resíduo seco entre o alho *in natura* e seus produtos. O alho frito foi a preparação que obteve o menor teor de matéria seca nos 3 momentos (respectivamente 1,49; 1,39 e 1,08 mg/mL).

Portanto, o alho frito tende a possuir maior quantidade de fenólicos em relação ao resíduo seco (µg/mg), porém quando não se baseia em resíduo seco este

produto é o que possui menor teor destes compostos em  $\mu\text{g/mL}$  de extrato. LANZOTTI (2006) em seu artigo de revisão verificou que o teor de quercitina diminuiu com a fritura. Tal fato ocorreu neste estudo com relação ao teor de fenólicos totais do extrato de alho frito com o alho *in natura*, sendo respectivamente 12,36 e 20,29  $\mu\text{g/mL/EAG}$  (tabela 3). Nos outros momentos também houve perda de fenólicos quando o alho foi frito. O tratamento térmico é um importante passo no processamento dos alimentos, porque pode trazer muitos benefícios para a preservação do mesmo, mas por outro lado pode trazer impactos negativos com relação ao teor das substâncias antioxidantes presentes nestes alimentos (DIPLOCK *et al.* 1998).

Apesar do conteúdo de fenólicos totais ser expressivo, este parâmetro não é necessariamente proporcional à atividade antioxidante (MOURE *et al.* 2001), considerando que as amostras estudadas também possuem outros compostos com atividade antioxidante, como os organosulfurados.

MILLER *et al.* (2000), estudando os compostos antioxidantes em vários vegetais frescos, verificaram que o alho (1300 equivalentes de trolox/100g) e a beterraba (800 equivalentes de trolox/100g) possuem maior teor de compostos fenólicos com ação antioxidante, quando comparados ao pepino (100 equivalentes de trolox/100g), ao salsão (50 equivalentes de trolox/100g), a cenoura (200 equivalentes de trolox/100g) e ao repolho verde (150 equivalentes de trolox/100g).

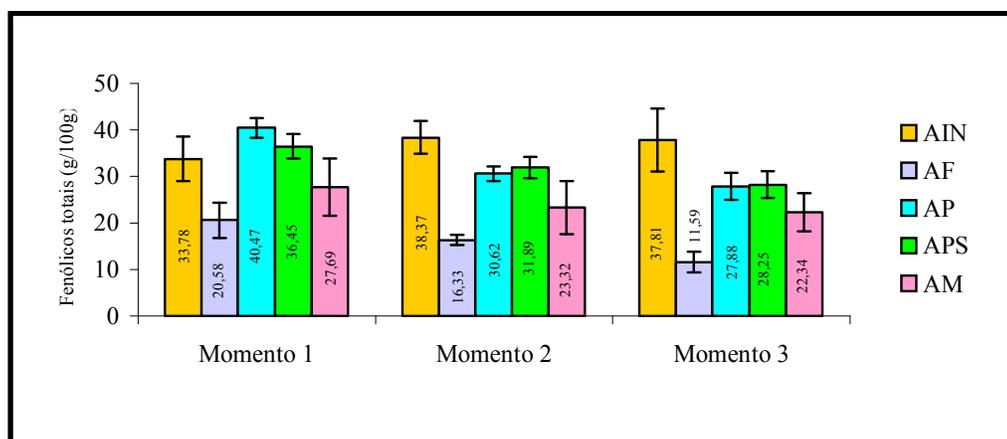
KAUR e KAPOOR (2002) quantificaram os compostos fenólicos totais de diferentes vegetais, inclusive o do alho *in natura*. Os resultados demonstraram que o alho possui um teor médio de fenólicos totais de 145 mg em equivalentes de catecol/100 g do produto. Neste caso, o padrão utilizado foi o catecol, e sendo que nesse estudo foi o ácido gálico, por isso a diferença de resultados.

NUUTILA *et al.* (2003) relataram que o alho *in natura* liofilizado, contém 11,5 mg EAG/100 g de compostos fenólicos e a sua casca 70,5 mg EAG/100 g; a cebola possui 84,5 mg EAG/100 g. Neste estudo, os teores de fenólicos totais por 100 g de alho *in natura* do momento 1, 2 e 3 foram respectivamente 33,78; 38,37 e 37,81 mg EAG/100 g de alho (figura 7), valor maior que o achado por NUUTILA, uma vez que a amostra do presente estudo é *in natura* enquanto que a do autor citado é liofilizada. Também a diferença de resultados pode-se justificar pelas diferentes

condições climáticas, solo, variedade botânica, técnicas de manuseio e armazenamento pós-colheita, que podem influenciar a composição química, segundo RIOS e PENTEADO (2003).

BENKEBLIA (2005) estudando alguns extratos de cebola e de alho verificou que o alho *in natura* possui elevado teor de fenólicos totais (49 mg/100 g em equivalente de ácido clorogênico) em comparação aos diferentes tipos de cebola (amarela = 34,7; vermelha = 44 e verde = 47,3 mg/100 g em equivalente de ácido clorogênico).

Os dados apresentados por MILLER *et al.* (2000), por KAUR e KAPOOR (2002) e por BENKEBLIA (2005) não são condizentes aos apresentados por este trabalho, apesar de terem utilizado alho *in natura*. Este fato se deve provavelmente as diferentes metodologias e padrões empregados.

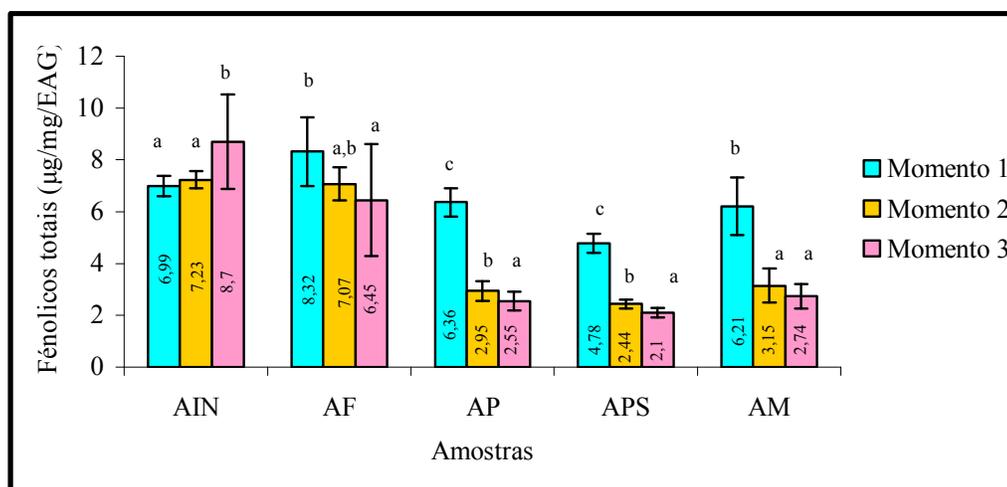


AIN = alho *in natura*; AF = alho frito; AP = alho picado sem sal; APS = alho picado com sal; AM = alho misto.  
\* n = número de amostras.

Figura 7 - Teor de fenólicos totais (g/100g) do alho *in natura* e de seus produtos, segundo os momentos (n\* = 9).

Observando-se as modificações ao longo da vida de prateleira (figura 8), verifica-se que o teor de fenólicos totais em relação ao resíduo seco tende a diminuir para todos os produtos, com exceção para o alho *in natura*, que aumentou significativamente no momento 3. Tal fato pode ser explicado pelo processamento ocasionado na industrialização das amostras de alho frito, picado sem sal, picado com sal e misto, não ocorrendo para *in natura* que foi mantido intacto. A integridade

na estrutura dos alimentos tem papel importante em proteger os antioxidantes quando em contato com o oxigênio atmosférico impedindo a oxidação dos mesmos (DIPLOCK *et al.* 1998). É importante ressaltar que os extratos correspondem a diferentes amostras do mesmo lote, o que pode justificar as diferenças do alho *in natura*.



AIN = alho *in natura*; AF = alho frito; AP = alho picado sem sal; APS = alho picado com sal; AM = alho misto. Letras diferentes na mesma amostra indicam diferença estatisticamente significante ( $p < 0,05$ ).

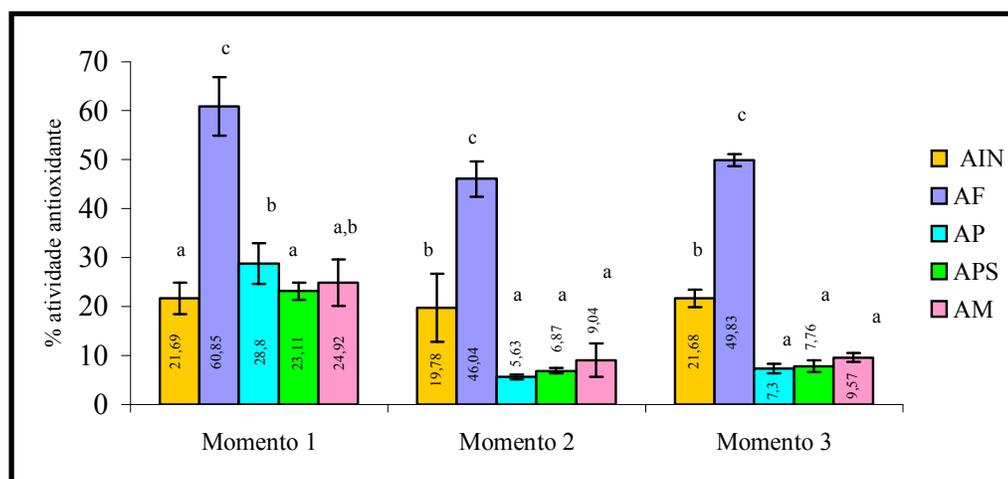
Figura 8 - Teor de fenólicos totais em relação ao resíduo seco do alho *in natura* e de seus produtos no decorrer da vida de prateleira.

## 2.5.2. Avaliação da atividade antioxidante

### 2.5.2.1. Ensaio radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)

Inicialmente, realizou-se o ensaio DPPH nas concentrações de 0,2 e 0,3 mg/mL, em que se observou que a atividade antioxidante nestas concentrações são baixas. Com isso optou-se por continuar a testar outras concentrações (1,0; 1,5 e 2,0 mg/mL), a fim de definir qual seria a melhor concentração. Foi verificado que não houve diferença considerável entre as concentrações, optando por trabalhar com a concentração de 1 mg/mL para este ensaio e para os demais testes realizados de atividade antioxidante.

Pode-se constatar que a atividade antioxidante, pelo ensaio DPPH, do alho *in natura* e de seus produtos, do **momento 1** (análise próxima à data de fabricação), são diferentes estatisticamente (figura 9 e/ou tabela no anexo 2, p. 123). O alho frito é o produto com maior atividade antioxidante, ou seja, possui 60,85 % ( $p < 0,001$ ). O alho picado sem sal apresentou melhor atividade antioxidante quando comparado com o alho *in natura* ( $p = 0,002$ ). Não houve diferença entre o *in natura*, o picado com sal e o misto. No **momento 2** (análise no período entre a fabricação e validade), o alho frito também foi o produto que apresentou melhor atividade antioxidante (46,04 %). O AIN apresentou o segundo melhor resultado, ou seja, 19,78 % de atividade antioxidante. Em relação ao alho picado sem sal, o com sal e o misto não houve diferença. Os resultados do **momento 3** (análise próxima ao fim da data de validade) foram iguais aos do momento 2, isto é, o frito teve a melhor atividade antioxidante, e também não foi observado diferença estatisticamente significativa entre o picado sem sal, picado com sal e o misto.



AIN = alho *in natura*; AF = alho frito; AP = alho picado sem sal; APS = alho picado com sal; AM = alho misto.

Letras diferentes no mesmo momento indicam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

\* n = número de amostras.

Figura 9 – Atividade antioxidante, pelo ensaio DPPH, do extrato metanólico do alho *in natura* e de seus produtos comercializados, segundo os momentos ( $n^* = 9$ ).

O alho frito foi o produto que obteve melhor porcentagem de atividade antioxidante em relação as demais amostras, nos três momentos. Este fato pode ser justificado da seguinte maneira:

(1) as amostras de alho frito apresentaram um maior teor de fenólicos totais em relação ao resíduo seco, e a concentração utilizada para os testes de atividade antioxidante foi padronizada em 1 mg/ml. Como já foi citado, os compostos fenólicos são excelentes sequestradores de radicais livres;

(2) como se utiliza o óleo de soja para o processo de fritura, poderia estar ocorrendo aumento dos compostos fenólicos neste produto, pois o óleo é adicionado de antioxidantes sintéticos tercibutilhidroquinona –TBHQ (composto fenólico sintético) e ácido cítrico;

(3) em virtude do processamento, ocorre a formação de compostos antioxidantes que são originados da reação de Maillard. Esta é uma reação de escurecimento não enzimático que pode ocorrer durante processos térmicos muito intensos. Envolve inicialmente um açúcar redutor (aldeído) e grupos amina (de aminoácidos, peptídios e/ou proteínas) presentes no alho, finalizando com a formação do pigmento escuro melanoidina, as quais estão associadas a atividade antioxidante que, interrompem a cadeia da oxidação lipídica, removendo o oxigênio molecular e quelando metais. Lipídios também podem participar da reação. O principal requisito é a presença de grupos redutores, como grupos carbonila, que são formados durante a oxidação de lipídios insaturados (NICOLI *et al.* 1997; BOBBIO e BOBBIO 2001; MANZOCCO *et al.*, 2001). NICOLI *et al.* (1997) e DAGLIA *et al.* (2000) verificaram em seus estudos que os grãos torrados de café apresentaram maior atividade antioxidante que os grãos verdes (*crus*), que por sua vez contêm maiores concentrações de antioxidantes polifenólicos, sugerindo então, que a atividade antioxidante em grão de café submetidos a temperatura (torrefação), poderiam ser referentes a outros compostos. SALDANHA (2005) também verificou que com o processo de torrefação da erva-mate, a atividade antioxidante (utilizado o sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico) aumentou, mas não pelo aumento de fenólicos totais, e sim talvez, pela formação dos compostos antioxidantes originados da reação de Maillard. Um estudo realizado por MORALES e BABEL (2002) concluiu que as melanoidinas em meio aquoso exerciam maior atividade antioxidante quando

comparado ao ácido gálico, caféico, tânico e também ao Trolox®. Apesar de haver fortes razões da presença de melanoidinas e consequente atividade antioxidante no alho frito, é necessário realizar novos estudos a fim de investigar essa hipótese.

A combinação destes fatores justifica o fato do alho *in natura*, apesar de apresentar o maior teor de fenólicos totais em relação ao resíduo seco (figura 8) no momento 3 não refletir na atividade antioxidante em comparação ao alho frito (figura 9). Como já foi relatado anteriormente, apesar da quantidade de fenólicos totais ser expressiva, o conteúdo destes não é necessariamente diretamente proporcional à atividade antioxidante (MOURE *et al.* 2001).

NUUTILA *et al.* (2003) estudando a atividade antioxidante do extrato metanólico do alho e da cebola, concluíram que o alho *in natura* liofilizado possui 60,90 % de atividade antioxidante pelo método DPPH, utilizando uma concentração de 1000 mg/mL; e a cebola 44,4 % (concentração de 67 mg/ml), concluindo que o alho apresentou atividade antioxidante 15 vezes menor que a cebola. Por outro lado, BENKEBLIA (2005) estudando alguns extratos metanólicos de cebola e de alho, verificou que o alho possui maior atividade antioxidante (método DPPH) do que a cebola, ao contrário do que foi observado no estudo de NUUTILA *et al.* (2003). No presente estudo, a atividade antioxidante do alho *in natura* variou de 19,78 a 21,69 % (conforme a vida de prateleira), utilizando concentração de 1 mg/mL. Estes resultados são 300 vezes superior ao do estudo de NUUTILA *et al.* (2003).

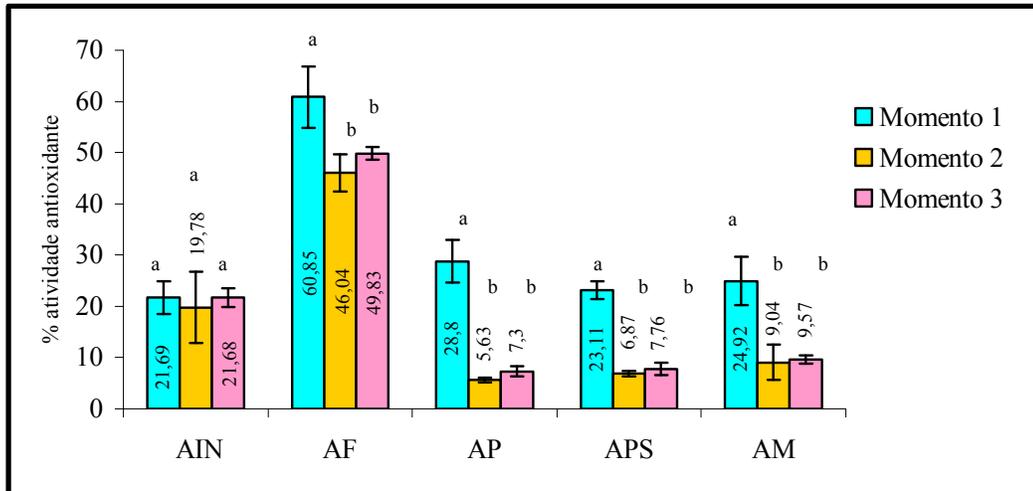
Além da concentração padronizada para as análises (1,0 mg/mL), realizou-se os ensaios para o padrão sintético BHT, na concentração máxima permitida pela Legislação Brasileira (0,2 mg/ml), afim de se avaliar possíveis variações. Isto se repetiu para os demais métodos utilizados para avaliar atividade antioxidante.

Os valores da porcentagem de captação do DPPH para o BHT do ensaio foi de 92,70 e 92,32 % para as respectivas concentrações de 0,2 mg/mL e 1,0 mg/mL. Todos os extratos de todos os momentos apresentaram menor atividade antioxidante em relação ao padrão BHT. De acordo com NAMIKI (1990) os antioxidantes naturais são menos efetivos do que os sintéticos. Convém salientar que os testes de atividade antioxidante, deste trabalho, foram feitos com extratos de alho, ou seja, diversas substâncias foram extraídas, além dos compostos fenólicos. Considerando que a proporção de fenólicos presentes nas amostras é bastante inferior ao padrão

BHT (tabela 3), os resultados de atividade antioxidante estão acima do esperado, ou seja, outros compostos presentes nos extratos podem ter apresentando ação antioxidante, como organosulfurados alicina, dialil dissulfito, entre outros (KIM *et al.* 1997; BOREX 2001). Tais resultados, também foram verificados por BENKEBLIA (2005), que utilizou extratos metanólicos de alho *in natura* pelo ensaio DPPH. Ao comparar os resultados com os padrões rutina e quercitina (compostos fenólicos) os valores do extrato de alho foram inferiores.

A atividade antioxidante no decorrer da vida de prateleira diminuiu para todos os produtos de alho, porém para o alho *in natura* não foi observado esta alteração (figura 10). O desempenho dos extratos pode ser justificado pela queda no teor de fenólicos totais no decorrer da vida de prateleira para as amostras de alho frito, picado sem sal, picado com sal e misto, enquanto que no alho *in natura* não foi observado esta diminuição (figura 8). Os processos de pasteurização, desidratação, cozimento e armazenamento podem diminuir significativamente o teor de substâncias antioxidantes nos alimentos (NICOLI *et al.* 1997). Segundo SHAHIDI *et al.* (1992), os compostos fenólicos são excelentes sequestradores de radicais livres, e como houve uma diminuição no teor de fenólicos, conseqüentemente houve redução na atividade antioxidante pelo método de sequestrar os radicais livres (DPPH).

PRIOR *et al.* (1998) relataram em seu estudo que a atividade antioxidante de cereais matinais não diminuiu substancialmente durante o armazenamento em temperatura ambiente. A atividade antioxidante da aveia foi analisada por 6 meses e foi verificado pequena diferença entre o primeiro e o sexto mês. Esta diferença era esperada, pois os antioxidantes são dispersos em uma matriz seca e sólida e com pequena exposição oxidativa. Em outro estudo realizado por estes autores, cereais matinais foram estocados a 37,8 °C (equivalente a 8 meses quando em temperatura ambiente). Depois de 8 semanas, a atividade antioxidante diminuiu menos que 10 %. Antioxidantes solúveis em lipídios são mais vulneráveis. Houve redução da atividade antioxidante, porém estes resultados são normais quando se estuda a vida de prateleira de cereais matinais. Comparando o estudo de PRIOR *et al.* (1998) com o presente estudo, observa-se diferença no comportamento das amostras no decorrer da vida de prateleira.



AIN = alho *in natura*; AF = alho frito; AP = alho picado sem sal; APS = alho picado com sal; AM = alho misto. Letras diferentes na mesma amostra indicam diferença estatisticamente significante ( $p < 0,05$ ).

Figura 10 – Atividade antioxidante, pelo ensaio DPPH, dos extratos de alho *in natura* e de seus produtos comercializados no decorrer da vida de prateleira.

Foram construídas as curvas cinéticas da captação do DPPH de todos os extratos durante os 20 minutos de ensaio, para uma melhor ilustração do mecanismo de ação antioxidante. Os resultados foram comparados ao padrão BHT em duas concentrações distintas (figuras 11, 12 e 13). Nos três momentos, é possível observar que o alho frito apresentou uma elevada atividade antioxidante, mas abaixo do padrão BHT em ambas as concentrações (0,2 e 1,0 mg/mL). Quanto menor os valores de absorbância, melhor a atividade antioxidante.

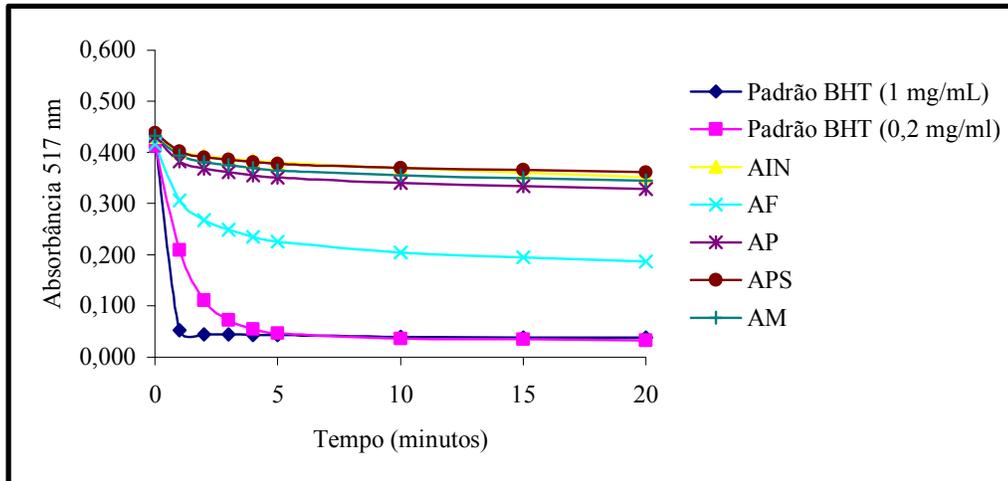


Figura 11 – Curva cinética da atividade antioxidante, pelo ensaio DPPH, do extrato metanólico do alho *in natura* e de seus produtos do momento 1.

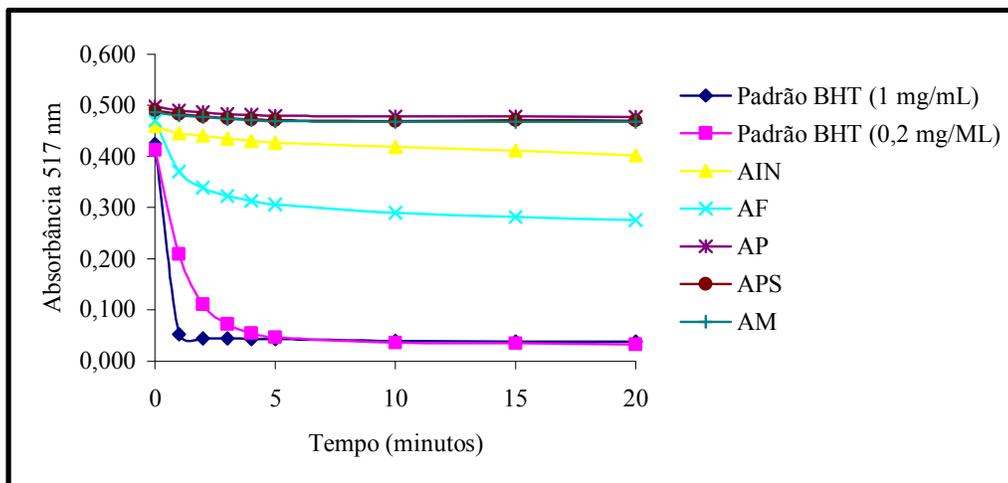


Figura 12 – Curva cinética da atividade antioxidante, pelo ensaio DPPH, do extrato metanólico do alho *in natura* e de seus produtos do momento 2.

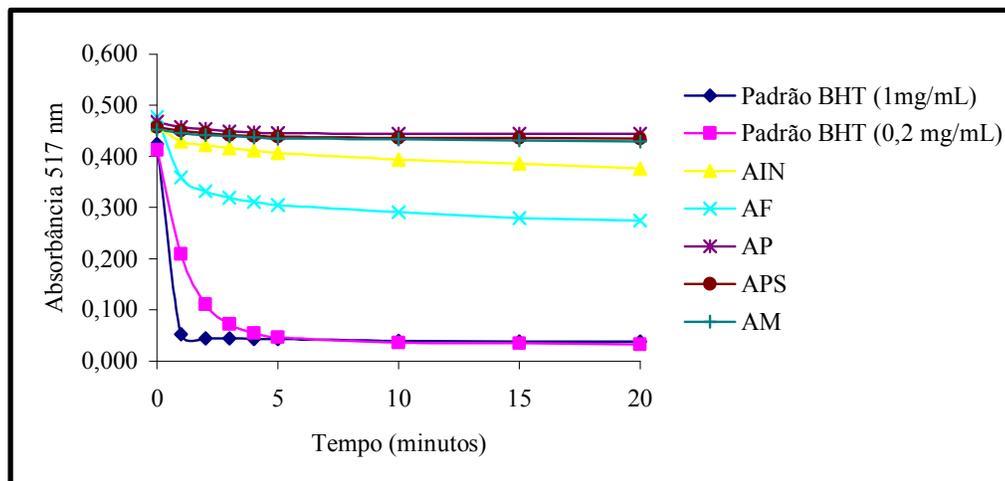


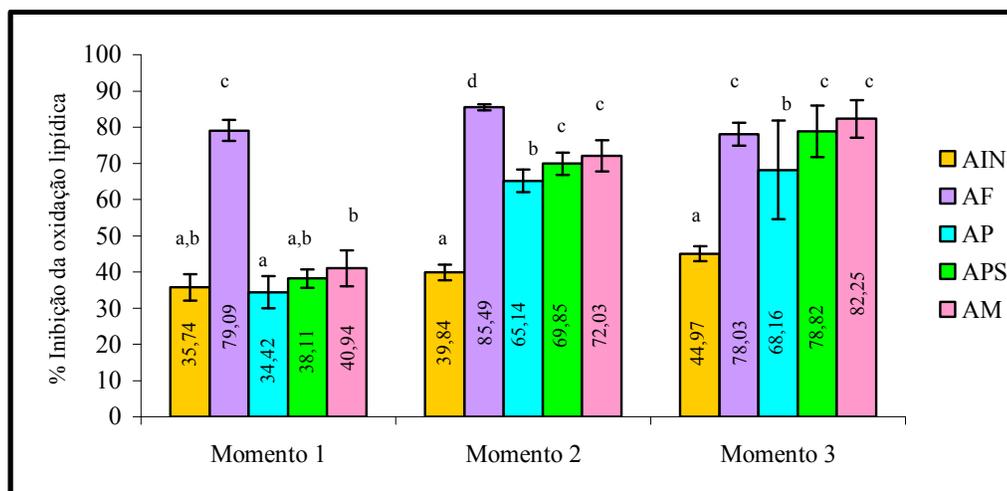
Figura 13 – Curva cinética da atividade antioxidante, pelo ensaio DPPH, do extrato metanólico do alho *in natura* e de seus produtos do momento 3.

#### 2.5.2.2. Sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoléico

O sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico é constituído por uma emulsão, sendo considerado um sistema aquoso-lipídico. Neste método a atividade antioxidante é avaliada pela capacidade de um extrato ou um antioxidante em inibir o processo de oxidação lipídica no sistema, ao longo de 120 minutos. Diferentemente do ensaio DPPH, os antioxidantes deverão apresentar maiores valores de absorbância indicando maior inibição da oxidação lipídica. Os resultados obtidos para os extratos estão apresentados na figura 14 e ou/tabela do anexo 3, p. 124.

Pode-se verificar que os resultados da inibição da oxidação lipídica do alho *in natura* e de seus produtos, dos três momentos, são diferentes estatisticamente. Nas análises próximas à data de fabricação (**momento 1**), o AF foi o produto que obteve a maior porcentagem da inibição da oxidação lipídica (79,09 %), seguido do AM (40,94 %). Em relação ao AIN, AP, e APS não foi observado diferença significativa. Para as análises entre a fabricação e validade (**momento 2**), o produto frito também foi o que apresentou melhor % IOL (85,49), seguido do AM e do APS. O AIN apresentou menor inibição, ou seja, 39,84 %. Já no **momento 3** (análise próxima à data de validade), não houve diferença entre o AF, o APS e o AM, sendo que estes

produtos apresentaram maior porcentagem da inibição da oxidação lipídica em relação ao AP e ao AIN. O alho *in natura* também apresentou menor inibição da oxidação lipídica, como ocorreu no momento 2.



AIN = alho *in natura*; AF = alho frito; AP = alho picado sem sal; APS = alho picado com sal; AM = alho misto.  
 Letras diferentes no mesmo momento indicam diferença estatisticamente significante ( $p < 0,05$ ).  
 \* n = número de amostras.

Figura 14 – Inibição da oxidação lipídica (IOL), pelo sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico, do extrato metanólico do alho *in natura* e de seus produtos comercializados dos momentos 1, 2 e 3 ( $n^* = 9$ ).

KAUR e KAPOOR (2002) determinaram a atividade antioxidante pelo sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico de diferentes vegetais, incluindo o alho *in natura*. Os autores obtiveram dois extratos, sendo um aquoso e o outro etanólico 80 %. Os resultados demonstraram que o alho inibiu em média 62,1 % (extrato etanólico) e 61,8 % (extrato aquoso) a oxidação lipídica. Neste estudo, não foi relatado a concentração utilizada para realizar o teste. Já no presente estudo o alho *in natura* inibiu em média para os momentos 1, 2 e 3 respectivamente 35,74, 39,84 e 44,97 % utilizando uma concentração de 1 mg/mL. A diferença dos resultados encontrados neste estudo com o estudo de KAUR e KAPOOR (2002) pode ser devido à concentração, as diferenças no solvente utilizado, além de outras características como cultivo, manuseio do alho, clima, solo, data de colheita e armazenamento. HOLUB *et al.* (2002) relataram que a adição de sulfato de amônio no solo para o plantio do alho, aumenta a concentração do composto sulfoxido de cisteína

(composto organosulfurado) nos bulbos de alho, que está relacionado à formação dos compostos bioativos do alho com propriedades antioxidantes. Outro fator importante, que influencia a composição do alho, é o período da colheita e armazenamento. Se o tempo da colheita atrasar em duas semanas, as substâncias allina e  $\gamma$ -glutamicisteína nos bulbos aumenta cerca de 20 %. Durante a cura, onde os bulbos ficam na sombra por duas semanas, a aliina aumenta em 25 %.

No presente estudo, o alho frito foi o produto que obteve a maior porcentagem de inibição da oxidação lipídica, e conseqüentemente melhor atividade antioxidante em relação às demais amostras. Como já foi relatado anteriormente no item 2.5.2.1, a explicação para o ocorrido, deve-se ao fato de:

(1) as amostras de alho frito apresentar maior teor de fenólicos totais em relação ao resíduo seco;

(2) o óleo de soja contém antioxidantes sintéticos (TBHQ e ácido cítrico), o que pode ter contribuído para o resultado encontrado. MELO *et al.* (2003) estudando a atividade antioxidante dos extratos de coentro, observaram que o extrato aquoso isolado exibiu 69,83 % de inibição da oxidação lipídica, pelo método  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico, e evidenciou que a sua combinação com BHT maximizou a ação antioxidante para 90,25 %, demonstrando forte sinergismo entre eles;

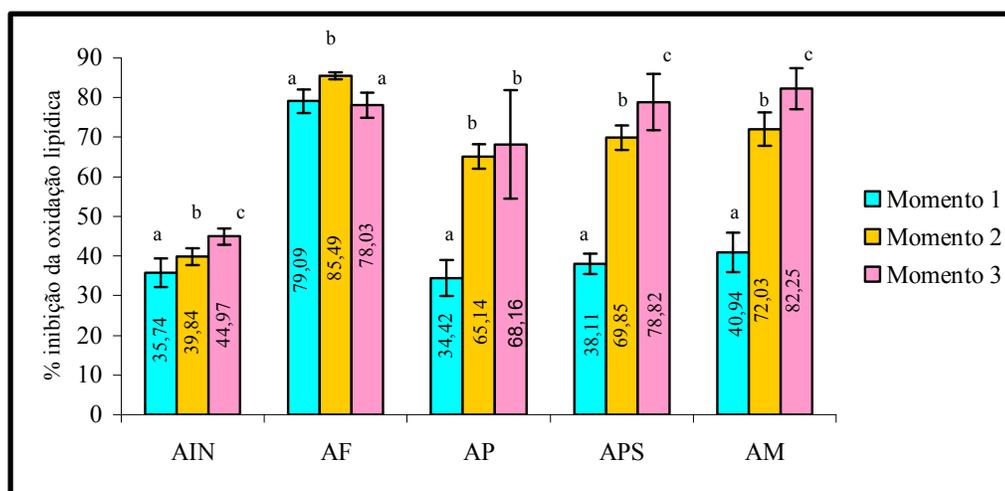
(3) ocorrer a formação de compostos com atividade antioxidante devido as reações de Maillard. NICOLI *et al.* (1997) estudando o processamento de tomates, verificaram que houve formação de compostos antioxidantes derivados da reação de Maillard, quando a temperatura de aquecimento foi de 95 °C.

O alho *in natura* foi o menos eficaz na inibição da oxidação lipídica nos três momentos. Como o alho *in natura* encontrava-se intacto até o manuseio, isto é, não foi processado (picado e/ou frito), é provável que houve menor formação de tiosulfinais voláteis e reativos, que são os compostos ativos com propriedades medicinais, entre as quais se inclui a alicina, que possui atividade antioxidante. Os compostos organosulfurados presentes no alho e em outras formas de preparação, depende das condições de processamento (HOLUB *et al.* 2002).

Na figura 15, pode ser verificado a inibição da oxidação lipídica no decorrer da vida de prateleira. Ao contrário do que ocorreu no ensaio DPPH, as amostras apresentaram aumento da atividade antioxidante no decorrer da vida de prateleira,

pelo sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico, sugerindo que outros compostos (organosulfurados ou melanoidinas) formados durante este período, contribuíram para o ocorrido.

O alho frito continua sendo a preparação que obteve a maior atividade antioxidante no decorrer da vida de prateleira. O alho *in natura* e o frito apresentaram inibição da oxidação lipídica maior no decorrer da vida de prateleira, mas não tão acentuada como nos alhos picado sem sal, picado com sal e misto, onde se nota resultados com valores dobrados. Esta elevação abrupta, pode ser explicada pela adição do conservador metabisulfito de sódio e do acidulante e antioxidante ácido cítrico nos produtos. O ácido cítrico e metabisulfito de sódio são substâncias que possuem a capacidade de sequestrar metais, formando quelatos e inibindo sua ação. Os agentes sequestrantes juntamente com os antioxidantes geram um efeito sinérgico em evitar oxidações em alimentos (FAGUNDES e AYUB 2005).



AIN = alho *in natura*; AF = alho frito; AP = alho picado sem sal; APS = alho picado com sal; AM = alho misto. Letras diferentes na mesma amostra indicam diferença estatisticamente significativa (p < 0,05).

Figura 15 - Inibição da oxidação lipídica (IOL), pelo sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico, dos extratos de alho *in natura* e de seus produtos comercializados no decorrer da vida de prateleira.

As curvas cinéticas que possibilitam verificar o comportamento dos extratos durante os 120 minutos do teste estão representados nas figuras 16, 17 e 18. Os resultados foram comparados ao controle e ao padrão BHT, sendo que este obteve a

porcentagem de inibição da oxidação lipídica de 95,32 e 97,23 % para as respectivas concentrações de 0,2 mg/mL e 1,0 mg/mL. Todos os extratos apresentaram valores inferiores ao padrão BHT em ambas as concentrações. Um estudo realizado por MELO *et al.* (2003) também verificou que os extratos aquoso, étereo e etanólico do coentro apresentaram proteção contra a oxidação lipídica inferior ao BHT. Segundo KULISIC *et al.* (2004) a atividade antioxidante do óleo de orégano, pelo sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico foi menor quando comparado ao BHT e ao  $\alpha$ -tocoferol. Convém salientar que os testes de atividade antioxidante, deste trabalho e dos citados acima, foram feitos com extratos, ou seja, diversas substâncias foram extraídas.

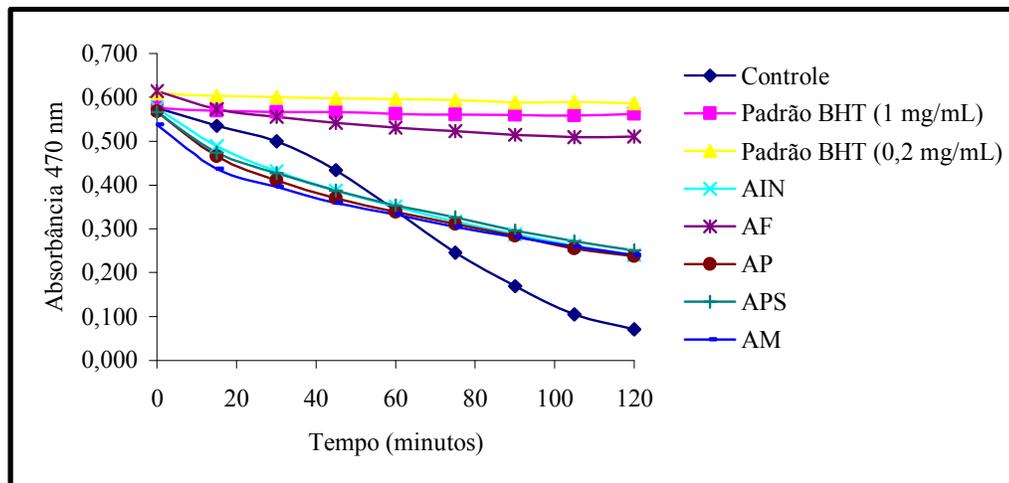


Figura 16 – Curva cinética da inibição da oxidação lipídica, pelo sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico, do extrato metanólico do alho *in natura* e de seus produtos do momento 1.

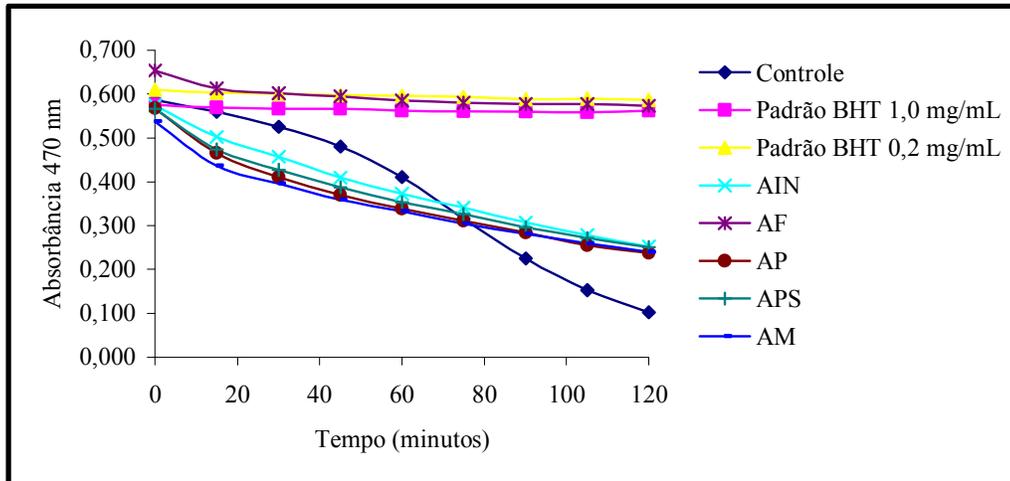


Figura 17 – Curva cinética da inibição da oxidação lipídica, pelo sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico, do extrato metanólico do alho *in natura* e de seus produtos do momento 2.

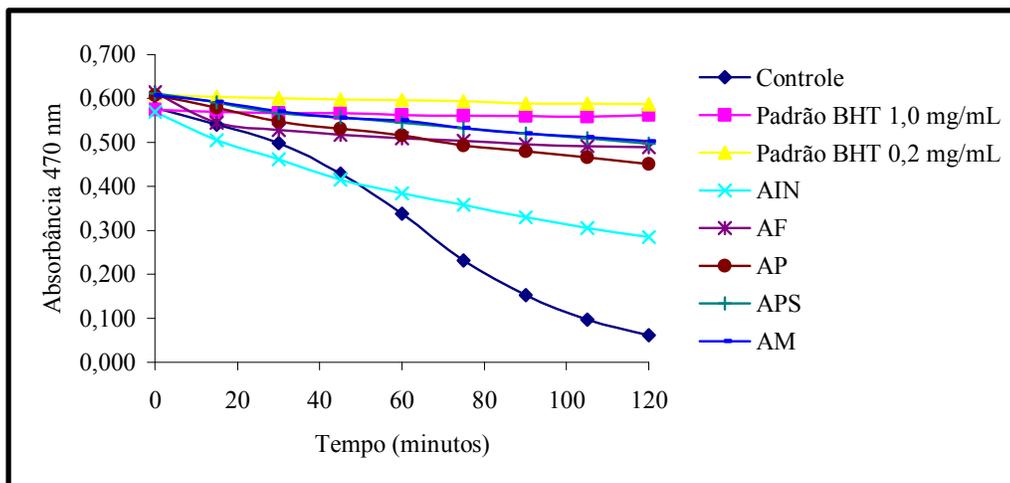
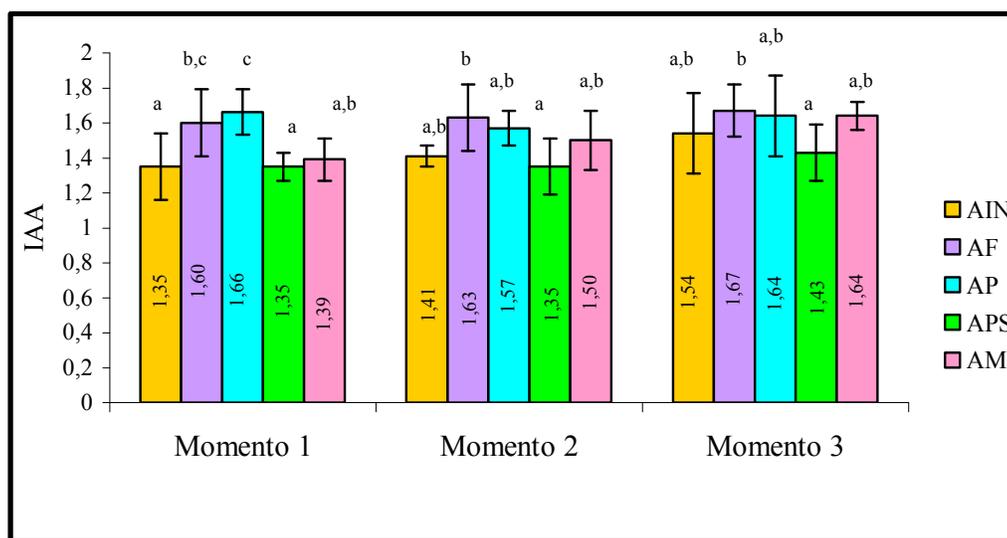


Figura 18 – Curva cinética da inibição da oxidação lipídica, pelo sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico, do extrato metanólico do alho *in natura* e de seus produtos do momento 3.

### 2.5.2.3. Avaliação da capacidade protetora da oxidação lipídica utilizando o aparelho Rancimat®

O aparelho Rancimat® tem sido apresentado como um método para determinar a resistência de um óleo à oxidação, e pode ser usado como um método para determinar a atividade antioxidante. As vantagens da técnica utilizando o aparelho Rancimat®, consistem no fato de se basear em medidas contínuas, ou seja, não requer determinações periódicas; além disso, o aparelho não requer supervisão no decorrer do experimento (HASENHUTTI e WAN 1992).

O alho *in natura* e seus produtos foram testados pelo aparelho Rancimat®, sendo que o índice de atividade antioxidante (IAA) dos extratos metanólicos das amostras nos três momentos estão apresentados na figura 19 e/ou tabela do anexo 4, p. 125. Quanto maior o valor do IAA, melhor a proteção oxidativa, e consequentemente melhor a atividade antioxidante.



AIN = alho *in natura*; AF = alho frito; AP = alho picado sem sal; APS = alho picado com sal; AM = alho misto.

IAA = tempo de indução (h) da amostra / tempo de indução (h) do controle

Letras diferentes no mesmo momento indicam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

\* n = número de amostras.

Figura 19 – Índice de atividade antioxidante (IAA), utilizando o aparelho Rancimat, do extrato metanólico do alho *in natura* e de seus produtos comercializados dos momentos 1, 2 e 3 ( $n^* = 6$ ).

Todas as amostras apresentaram atividade antioxidante. Conforme citado no item 2.4.2.4.3, o IAA foi calculado considerando-se o tempo de indução da amostra dividido pelo tempo de indução do controle. Ou seja, valores de IAA acima de 1,0 indicam que a amostra apresentou atividade antioxidante. No **momento 1** (análise próxima à data de fabricação), o alho picado sem sal e o frito apresentaram os melhores resultados de IAA, respectivamente 1,66 e 1,60. No **momento 2** (análise no período entre data de fabricação e data de validade), o frito apresentou um IAA = 1,63, sendo superior às demais amostras, e no **momento 3** (análise próxima ao fim da data de validade) este índice foi de 1,67.

Segundo GUERRA e LAJOLO (2005), a eliminação da água de um alimento pode acelerar a oxidação lipídica, tornando-se, portanto, um problema para produtos desidratados. Mas esta aceleração, depende não só do teor de umidade, mas, principalmente da atividade de água presente. Os efeitos da atividade de água também tem importância em termos de ação antioxidante, pois o estudo destes autores concluíram que os compostos apolares do coentro e da salsa são mais eficientes em baixas atividade de água tendo a sua ação diminuída com o aumento da água no sistema; com os compostos polares ocorreu o inverso. No presente estudo, o extrato metanólico de AP em comparação com o extrato de AM, apresentou diferença significativa no IAA. Então, pode-se concluir que o alho desidratado adicionado ao alho *in natura* picado, para se obter o alho misto, pode ter acelerado o processo de oxidação lipídica, sendo este dado condizente ao citado por GUERRA e LAJOLO (2005).

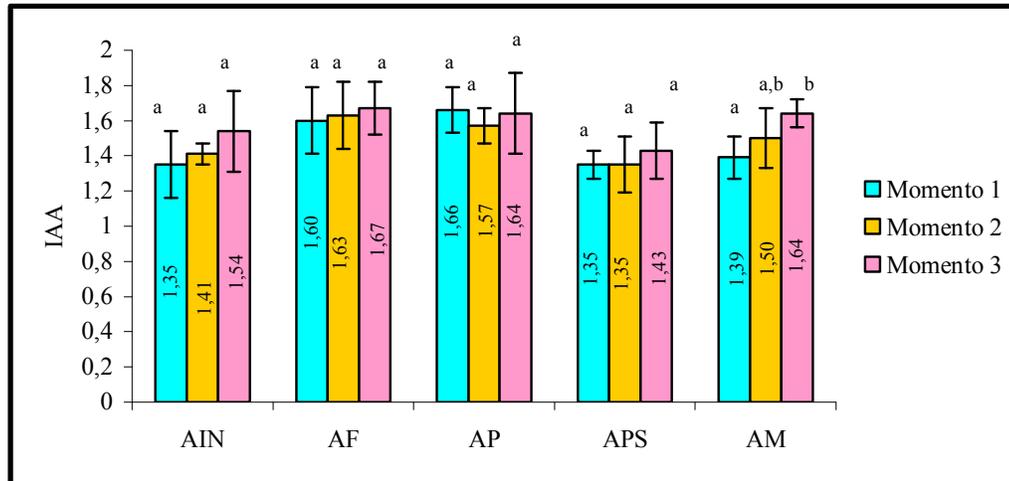
Novamente o alho frito foi o produto com maior índice de atividade antioxidante, fato este também observado nos outros dois métodos utilizados no presente estudo. Este resultado era esperado, pois conforme mencionado nos itens 2.5.2.1 e 2.5.2.2, o extrato de AF possui uma maior concentração de fenólicos em relação as outras amostras, além dos produtos da reação de Maillard e antioxidantes do óleo de soja, que podem ter contribuído com os resultados superiores.

MOREIRA e MANCINI-FILHO (2003) empregando o aparelho Rancimat® a 110<sup>0</sup> C, com fluxo de gás de 20L/h, e utilizando 5 g de óleo de soja sem aditivos, verificaram que os extratos das especiarias canela, erva-doce e semente de mostarda, obtidos de forma sequencial, apresentaram atividade antioxidante, sendo que o

extrato aquoso da semente de mostarda a 100 ppm apresentou o maior índice de atividade antioxidante (IAA = 1,19). MURCIA *et al.* (2004) avaliando as propriedades antioxidantes de sete especiarias e comparando-as com a do BHA, BHT e propil galato, empregando o aparelho Rancimat® a 100<sup>o</sup> C, encontraram que a noz moscada, o gengibre e o alcaçuz protegeram os óleos de girassol, milho e oliva, bem como a manteiga e a margarina, contra a oxidação. SALDANHA (2005) observou que os extratos (aquoso, etanólico e etéreo) de erva-mate tostada possui maior atividade antioxidante do que o da erva-mate verde (utilizando as mesmas condições e substrato do presente trabalho). Estes resultados foram discutidos considerando-se a possibilidade dos produtos da reação de Maillard terem potencializado a atividade antioxidante, assim como pode ter ocorrido com o alho frito deste trabalho. FERNÁNDEZ-LÓPEZ *et al.* (2005) verificaram que o suplemento de alho, rico em alicina, quando utilizado em almôndegas bovina, não inibiu a oxidação lipídica, medida pelo aparelho Rancimat®, pois o índice de estabilidade lipídica foi menor quando comparado ao controle. Segundo o autor, isto pode ser justificado pela alta concentração do composto alicina que está presente neste suplemento, sendo que a alicina em altas concentrações tem efeito pró-oxidante.

O valor do índice de atividade antioxidante para o padrão BHT do ensaio foi de 2,00 e 2,50 para as respectivas concentrações de 0,2 mg/mL e 1,0 mg/mL. Todas as amostras apresentaram valores inferiores ao padrão, sendo este um resultado esperado, pois conforme citado anteriormente, o padrão foi utilizado na forma pura, e as amostras de alho contém, em seu extrato, diversas outras substâncias além dos compostos antioxidantes.

Verifica-se que o índice de atividade antioxidante (IAA) no decorrer da vida de prateleira (figura 20) tende a manter ou aumentar ao longo do tempo estudado, assim como já foi verificado para o sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico. Já no ensaio DPPH, a atividade antioxidante decaiu ao longo do tempo. Vale ressaltar a importância de se utilizar vários métodos para avaliar a capacidade antioxidante de um alimento, pois cada método possui um mecanismo diferente, o que pode gerar diferentes resultados.



AIN = alho *in natura*; AF = alho frito; AP = alho picado sem sal; APS = alho picado com sal; AM = alho misto.

IAA = tempo de indução (h) da amostra / tempo de indução (h) do controle

Letras diferentes na mesma amostra indicam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

Figura 20 – Índice de atividade antioxidante (IAA), utilizando o aparelho Rancimat, do extrato metanólico do alho *in natura* e de seus produtos comercializados no decorrer da vida de prateleira.

### 2.5.3. Correlações entre as variáveis

Com os valores obtidos de fenólicos totais e da atividade antioxidante (ensaio DPPH, sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico e avaliação da capacidade protetora da oxidação lipídica, utilizando o aparelho Rancimat), foi verificada as correlações entre os métodos, conforme indicado na tabela 4.

Tabela 4 – Correlações entre as variáveis do alho *in natura* e de seus produtos comercializados dos momentos 1, 2 e 3.

| Momento | Amostra                     | Variável          | Fenólicos Totais* | Sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoleico | DPPH    | Rancimat |
|---------|-----------------------------|-------------------|-------------------|---|---------|----------|
| 1       | alho <i>in natura</i> (AIN) | CP                | 1,000             |   |         |          |
|         |                             | NS                | -                 |   |         |          |
|         | alho frito (AF)             | CP                | 1,000             |   |         |          |
|         |                             | NS                | -                 |   |         |          |
|         | alho picado sem sal (AP)    | CP                | 1,000             |   | - 0,786 | 0,829    |
|         |                             | Fenólicos Totais* | NS                | -   | 0,012   | 0,006    |
|         | alho picado com sal (APS)   | CP                | 1,000             |   |         |          |
|         |                             | NS                | -                 |   |         |          |
|         | alho misto (AM)             | CP                | 1,000             |   |         | 0,923    |
|         |                             | NS                | -                 |   |         | 0,000    |
| 2       | alho <i>in natura</i> (AIN) | CP                | 1,000             |   |         |          |
|         |                             | NS                | -                 |   |         |          |
|         | alho frito (AF)             | CP                | 1,000             |   |         |          |
|         |                             | NS                | -                 |   |         |          |
|         | alho picado sem sal (AP)    | CP                | 1,000             |   |         |          |
|         |                             | Fenólicos Totais* | NS                | -   |         |          |
|         | alho picado com sal (APS)   | CP                | 1,000             |   |         |          |
|         |                             | NS                | -                 |   |         |          |
|         | alho misto (AM)             | CP                | 1,000             |   | 0,754   |          |
|         |                             | NS                | -                 |   | 0,019   |          |
| 3       | alho <i>in natura</i> (AIN) | CP                | 1,000             |   | - 0,831 |          |
|         |                             | NS                | -                 |   | 0,006   |          |
|         | alho frito (AF)             | CP                | 1,000             |   | 0,730   |          |
|         |                             | NS                | -                 |   | 0,025   |          |
|         | alho picado sem sal (AP)    | CP                | 1,000             |   | - 0,693 | 0,922    |
|         |                             | Fenólicos Totais* | NS                | -   | 0,038   | 0,009    |
|         | alho picado com sal (APS)   | CP                | 1,000             |   | - 0,837 | 0,842    |
|         |                             | NS                | -                 |   | 0,005   | 0,035    |
|         | alho misto (AM)             | CP                | 1,000             |   | - 0,723 |          |
|         |                             | NS                | -                 |   | 0,028   |          |

\* Fenólicos totais em relação ao resíduo seco.

CP = Correlação de Pearson; NS = Nível de significância; espaços em branco não houve correlação.

Quando as amostras foram analisadas próximas à data de fabricação - **momento 1** houve correlação positiva entre fenólicos totais e o ensaio DPPH para os alhos picado sem sal (AP) e para o misto (AM), sugerindo que os compostos fenólicos são bons sequestradores de radicais livres. Entre fenólicos totais e sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico ocorreu correlação negativa para o alho picado sem sal (CP = - 0,786), ou seja, a inibição da oxidação lipídica pelo sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico é inversamente proporcional ao teor de fenólicos totais.

Para as análises no período entre a data de fabricação e a data de validade (**momento 2**), não houve correlação para a maior parte das amostras. Somente para o AM, verificou-se correlação positiva entre fenólicos totais e o sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico, dado também verificado em outro estudo, que relatou correlação positiva (CP = 0,657,  $p < 0,005$ ) do teor de fenólicos de diferentes vegetais, incluindo o alho, com sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico (KAUR e KAPPOR 2002).

Quanto às análises próximas ao fim da data de validade (**momento 3**), os resultados foram:

- houve correlação negativa entre fenólicos totais e o sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico para o alho picado com sal e para o misto;
- correlação negativa entre o ensaio DPPH e fenólicos totais para os produtos AIN e AP, sendo - 0,831 e - 0,693 respectivamente. Já para o AF houve correlação positiva entre estes dois métodos;
- resultados do aparelho Rancimat® e fenólicos totais houve correlação positiva para o alho picado sem sal e com sal.

Como se verifica na tabela 4, algumas correlações entre os métodos e teor de fenólicos totais se apresentaram negativa. Tal fato pode ser justificado pela presença de outros compostos, que não os fenólicos, que podem ter contribuído para a atividade antioxidante. Como citado anteriormente, o alho é fonte de compostos organosulfurados que também apresentam potencial antioxidante.

Para o alho misto foram verificadas respostas diferentes de correlação entre fenólicos totais e o sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico, quando se observa os três momentos da vida de prateleira. No momento 1 não houve correlação entre estes métodos, enquanto que no momento 2 a correlação foi positiva (CP = 0,754), e no

momento 3 foi negativa (CP = - 0,723). A variação das correlações encontradas se devem, provavelmente, a dois fatores:

- (1) teor de compostos organosulfurados (mencionado no parágrafo anterior);
- (2) composição da amostra. O alho misto, como citado anteriormente, é composto de alho *in natura* (origem brasileira) e alho desidratado (origem chinesa). Como a variedade botânica do alho desidratado é desconhecida, pode-se supor que a composição de compostos bioativos deste produto é diferente das amostras brasileiras. Como citado por HOLUB *et al.* (2002), o teor de compostos bioativos no alho pode variar consideravelmente conforme sua variedade botânica, condições climáticas e tipo de processamento, entre outros fatores.

Para alguns resultados deste trabalho verificou-se correlação positiva entre atividade antioxidante e fenólicos totais como também foi verificado por NUUTILA *et al.* (2003) em extratos de alho e cebolas; PAREJO *et al.* (2003), em plantas Bolivianas; ISHIMOTO (2003) em vinhos e sucos de uva brasileiros. Por outro lado, também foi detectada ausência de correlação entre estas duas variáveis. Da mesma forma, este dado foi verificado por BOCCO *et al.* (1998) que pesquisaram a atividade antioxidante em frutas e resíduos de frutas cítricas.

## 2.6. Conclusão

- O teor de fenólicos totais em relação ao resíduo seco foi maior para o produto frito (momentos 1 e 2). Em relação à vida de prateleira foi observado que o processamento influenciou no teor de fenólicos totais para todas as amostras;
- O AF foi o produto comercializado que apresentou melhor atividade antioxidante pelo ensaio DPPH (captação de radicais livres), melhor inibição da oxidação lipídica pelo sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico e melhor índice de atividade antioxidante (IAA) utilizando o aparelho Rancimat®, em todos os momentos;
- O processo de fritura, possivelmente, contribuiu para a formação de novas substâncias com propriedades antioxidantes, como as melanoidinas, o que pode ter contribuído para os melhores resultados de atividade antioxidante, bem como os aditivos adicionados no óleo de fritura;
- A atividade antioxidante, pelo ensaio DPPH, diminuiu no decorrer da vida de prateleira para todos os produtos de alho, porém para o alho *in natura* não foi observado esta alteração;
- O AIN foi a amostra menos eficaz na inibição da oxidação lipídica, pelo sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico, nos três momentos;
- Ao longo da vida de prateleira, pelo sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico, todas as amostras apresentaram aumento da atividade antioxidante, onde se constataram resultados com valores dobrados para o AP, APS e AM;
- O índice de atividade antioxidante medido pelo aparelho Rancimat® ao longo da vida de prateleira apresentou uma tendência em manter ou aumentar;
- Os diferentes métodos utilizados para avaliar a atividade antioxidante do alho *in natura* e seus produtos apresentaram respostas diferentes, sendo que para os métodos que continham lipídio como substrato (sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico e Rancimat) houve aumento da capacidade antioxidante no decorrer

da vida de prateleira. Por outro lado, no ensaio do DPPH, que se baseia na remoção de radicais livres, ocorreu diminuição da atividade antioxidante, sendo este resultado esperado, considerando a redução de compostos fenólicos ao longo da vida de prateleira;

- Entre fenólicos totais e atividade antioxidante foi verificado tanto ausência de correlação, quanto presença de correlação positiva e negativa. Fatores como variedade botânica, condições climáticas, qualidade e quantidade de compostos bioativos, processamento e a presença de aditivos podem justificar a variabilidade entre as correlações.

## 2.7. Considerações finais

Os resultados obtidos neste estudo reafirmam a hipótese de que os compostos bioativos do alho *in natura* e seus produtos comercializados são potencialmente benéficos à saúde, uma vez que foi demonstrada a sua capacidade em seqüestrar os radicais livres e inibir a oxidação lipídica, em todas as amostras e em todos os momentos estudados, ainda que algumas amostras tenham apresentado melhor atividade antioxidante.

Contudo, vale ressaltar que resultados obtidos em experimentos *in vitro* nem sempre são reproduzidos *in vivo*, portanto não necessariamente o consumo de alho irá reproduzir o mesmo efeito no organismo.

Com relação aos compostos responsáveis pela atividade antioxidante, outros compostos, além dos fenólicos, podem ter contribuído com os resultados apresentados. Isto vale particularmente para as amostras de alho frito que apresentaram um potencial antioxidante superior às demais amostras. Assim, outros estudos são necessários para avaliar o comportamento destas outras substâncias, tanto em sistemas *in vitro* quanto *in vivo*.

No próximo capítulo, será abordada a influência dos aditivos alimentares na atividade antioxidante dos produtos de alho.

## CAPÍTULO 3

### “INFLUÊNCIA DOS ADITIVOS ALIMENTARES NA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS PRODUTOS DE ALHO”

#### 3.1. Introdução

A cultura do alho (*Allium sativum*) é importante não apenas por seu valor comercial, mas, também, por suas propriedades medicinais. Todavia, a quantidade e qualidade da produção nacional de alho não atendem à crescente demanda e às exigências do mercado consumidor brasileiro, o que induz à importação. Nos últimos anos, com a geração de novas tecnologias, principalmente em Santa Catarina e Minas Gerais, onde se concentram as maiores áreas de cultivo e produtividade, vem aumentando a qualidade na produção nacional (AMORIM *et al.* 2002).

O consumo de produtos obtidos a partir do alho *in natura* tem aumentado nos últimos anos, não só por ser apreciado como especiaria e ser de fácil utilização na culinária, mas também por algumas qualidades terapêuticas que a ele são atribuídas.

A principal perda de qualidade do processamento do alho é causada pelo escurecimento, que ocorre devido à ação da enzima polifenoxidase sobre os compostos fenólicos, os quais são oxidados a ortoquinonas e estes polimerizam facilmente formando compostos escuros, ou seja, as melaninas (BERBARI *et al.* 2003).

Atualmente, a indústria de alimentos tem sido beneficiada pelo surgimento de novas substâncias que podem ser adicionadas aos alimentos com o objetivo de melhorar a cor, o aroma, a textura e o sabor. Estas substâncias são conhecidas como aditivos alimentares. Os aditivos alimentares correspondem a qualquer substância presente por adição intencional, ou não, a um alimento, com finalidades tecnológicas como conservação contra deteriorações bacterianas, proteção contra alterações oxidativas e fornecimento de características sensoriais (BARUFFALDI e OLIVEIRA 1998; SILVA 2000).

Segundo BOBBIO e BOBBIO (1995); BARUFFALDI e OLIVEIRA (1998) e SILVA (2000), a legislação brasileira reconhece e permite o uso das seguintes classes de aditivos em alimentos:

- corante: a substância que confere ou intensifica a cor dos alimentos;
- aromatizante: a substância ou mistura de substâncias, possuidoras de propriedades odoríferas, capazes de conferir ou intensificar aroma e/ou sabor dos alimentos, incluindo as bebidas;
- antioxidante: substância que retarda o aparecimento de alterações oxidativas nos alimentos;
- estabilizante: substância que favorece e mantém as características físicas das emulsões e suspensões;
- espessante: substância capaz de aumentar, nos alimentos, a viscosidade de soluções, emulsões e suspensões;
- edulcorante: substância orgânica artificial, não glicídica, capaz de conferir sabor doce aos alimentos;
- umectante: substância capaz de reduzir as características higroscópicas dos alimentos;
- acidulante: substância capaz de comunicar ou intensificar o sabor ácido dos alimentos. O ácido cítrico (figura 21), aditivo normalmente adicionado ao alho, é um acidulante versátil e muito utilizado pelas indústrias de alimentos, tendo como características a alta solubilidade, a ação sequestrante de íons metálicos (que previne reações indesejáveis de oxidação de cor e aromas), segurança na manipulação, inocuidade do ponto de vista de saúde e baixa corrosividade das instalações industriais. Desta forma, sua utilização se constitui em uma alternativa simples e segura para o processamento industrial dos produtos de alho (LINDSAY 1993; BERBARI 2003). O ácido cítrico também atua como antioxidante e como sinergista (SILVA 2000).
- conservadores: substâncias que impedem ou retardam as alterações dos alimentos, provocadas por microorganismos ou enzimas. Nas amostras de alho estão presentes os conservadores benzoato de sódio e metabisulfito de sódio. O ácido benzóico e benzoatos são os conservadores mais antigos utilizados em alimentos. Tanto o ácido quanto seus sais são eficazes contra bolores e leveduras. A maior

solubilidade em água e a não interferência na coloração tornam o benzoato de sódio (figura 22) o mais utilizado, sendo este outro aditivo também adicionado nos produtos de alho. Os benzoatos têm a propriedade de serem inócuos para o emprego em alimentos, porém é estabelecido um nível máximo de 0,3 g/100g. Outro conservador muito utilizado em alimentos é o dióxido de enxofre e derivados. Hoje em dia, o gás é raramente utilizado, sendo substituído por outros compostos geradores de dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>), como o sulfito de sódio (Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>), o sulfito ácido de sódio (NaHSO<sub>3</sub>) e o metabisulfito de sódio (dissulfito de sódio – Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) (figura 23). Os sais de sulfito possuem a vantagem de serem facilmente manuseáveis e quando dissolvidos em água formam ácido sulfuroso, íon bissulfito e íon sulfito, que agem sobre as bactérias e fungos. Os metabissulfitos são mais estáveis que os bissulfitos (BARUFFALDI 1998; SILVA 2000; TFOUNI e TOLEDO 2002; ARAÚJO 2004; COULATE 2004). O metabisulfito de sódio, além de atuar sobre as bactérias e fungos, também atua como antioxidante para prevenir a oxidação (seqüestrador de oxigênio e agentes redutores); na inibição de várias enzimas, incluindo proteases, oxidases e peroxidases, e por último, atuam como agentes quelantes (POPOLIM 2004).

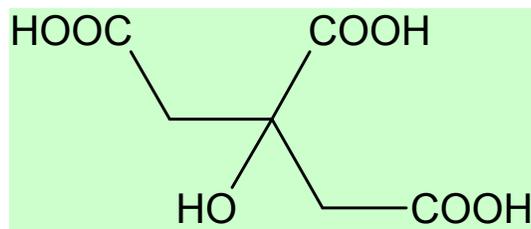


Figura 21 - Estrutura química do ácido cítrico

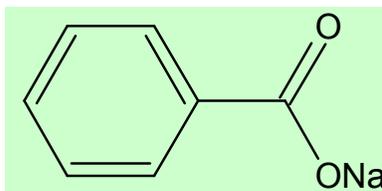


Figura 22 - Estrutura química do benzoato de sódio

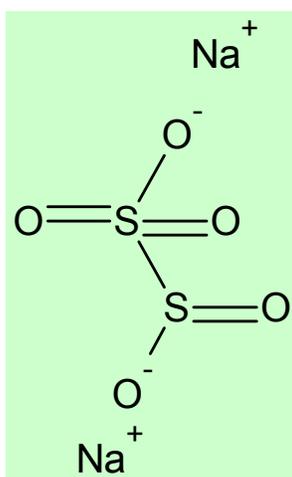


Figura 23 - Estrutura química do metabisulfito de sódio

Poucas são as informações bibliográficas disponíveis sobre o processamento e conservação dos produtos de alho, pois a maioria delas encontra-se na forma de patentes (BERBARI *et al.* 2003).

O consumo de aditivos sintéticos em alimentos e seu potencial tóxico (NAMIKI 1990, AMARAL *et al.* 2002) é uma preocupação, não somente por parte do consumidor, como também de pesquisadores, impulsionando a busca de compostos de origem natural. No caso dos antioxidantes, estes podem ser substituídos total ou parcialmente por antioxidantes naturais presentes nos alimentos.

De fato, as pesquisas na área de antioxidantes naturais estão aumentando. O alho é uma das principais especiarias utilizadas na culinária do Brasil, e de vários

outros países. Suas excepcionais características de sabor e principalmente de aroma contribuem diretamente para sua excelente aceitação como especiaria. Os compostos organosulfurados voláteis são responsáveis pelas características de odor dos mesmos (CARVALHO *et al.* 1991). Além dos compostos organosulfurados, o alho contém compostos fenólicos, sendo que ambos possuem propriedades antioxidantes.

Além da utilização em alimentos a fim da preservação da oxidação lipídica, melhorando a qualidade sensorial e nutricional, os antioxidantes são vistos como benéficos ao organismo, pois já foi verificado que reações de oxidação de biomoléculas podem estar relacionadas a distúrbios nos organismos, especialmente ao câncer (MENEHINI 1988) e as doenças cardiovasculares (ESTERBAUER *et al.* 1992).

### **3.2. Justificativa**

A busca por produtos prontos para consumo cresceu na última década, incentivando o desenvolvimento de tecnologias que permitam a fabricação do alho com qualidade. O processamento do alho em pasta ou picado para consumo, de modo que se mantenha estável à temperatura ambiente, facilita a sua utilização pelo consumidor. Assim, a tecnologia empregada permite que o alho e seus produtos apresentem as seguintes vantagens: segurança do ponto de vista microbiológico e manutenção das características sensoriais.

Considerando o interesse na manutenção das propriedades citadas acima, além da ação antioxidante, o alho e seus produtos processados necessitam do acréscimo de aditivos. Assim, julga-se necessário comparar a atividade antioxidante nos diferentes produtos de alho, com e sem aditivos.

### **3.3. Objetivos**

#### **3.3.1. Objetivo Geral**

Avaliar e comparar a atividade antioxidante *in vitro* do extrato metanólico de diferentes produtos de alho, com e sem aditivos.

#### **3.3.2. Objetivos Específicos**

- Quantificar os compostos fenólicos totais dos produtos de alho sem aditivos, e comparar os resultados com os produtos com aditivos;
- Determinar a atividade antioxidante por três métodos analíticos nos produtos sem aditivos, e comparar os resultados com os produtos com aditivos;

### **3.4. Materiais e Métodos**

#### **3.4.1. Materiais**

##### **3.4.1.1. Solventes e reagentes**

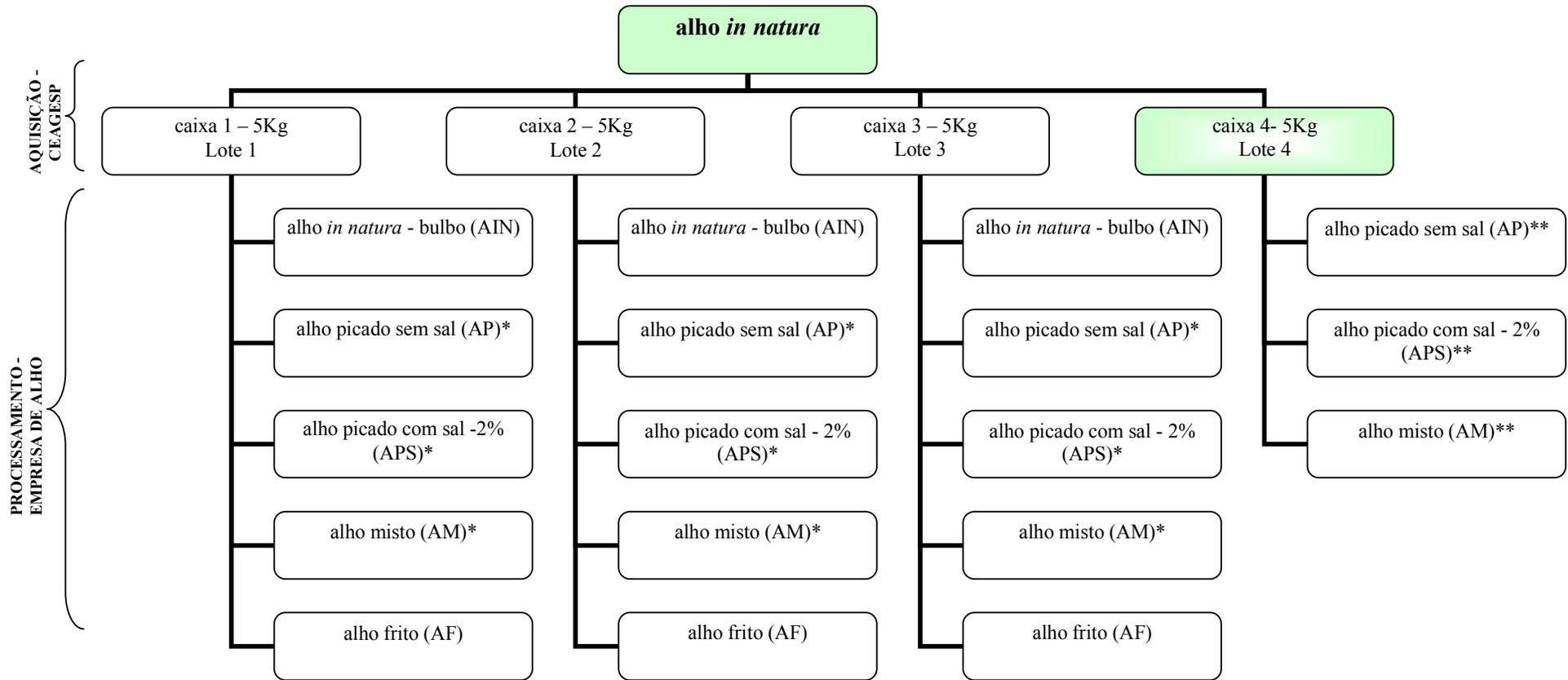
A procedência dos solventes e reagentes utilizados nos experimentos foi: CAAL Produtos Químicos Ltda, Sigma Aldrich Brasil Ltda, Merck S.A. produtos para laboratório Ltda, Synth- Labsynth produtos para laboratórios Ltda. Estes produtos são de grau analítico.

##### **3.4.1.2. Amostras**

As amostras de alho *in natura* foram obtidas na Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo (CEAGESP). Posteriormente, estas amostras foram

enviadas para a empresa Fresh Garlic, onde foram processadas em alho picado com sal, sem sal e misto, todas sem aditivos, conforme descrito na figura 24. As amostras foram armazenadas em temperatura ambiente.

As amostras dos produtos de alho sem aditivos correspondem ao lote quatro.



\* As amostras de alho picado sem sal, picado com sal (2%) e misto dos lotes 1, 2 e 3, contém em sua composição os seguintes aditivos: ácido cítrico, metabisulfito de sódio e benzoato de sódio. Para cada 10 Kg destes produtos foram utilizados 800 g de ácido cítrico, 15 g de metabisulfito de sódio e 6 g de benzoato de sódio. Já as amostras de alho *in natura* e frito não possuem nenhum aditivo.

\*\* As amostras do lote 4 não contém aditivos.

Figura 24 – Esquema das amostras obtidas de alho sem aditivos (lote 4).

### **3.4.2. Métodos**

#### **3.4.2.1. Obtenção do extrato metanólico**

A metodologia utilizada para obter os extratos das amostras sem aditivos (alho picado sem sal, picado com sal e misto) foi a mesma utilizada para obter os extratos de alho comercializado, ou seja, metodologia descrita por NUUTILA *et al.* (2003), porém com modificações (item 2.4.2.1).

Os extratos foram colocados em frascos âmbar, sob atmosfera de nitrogênio e armazenados no freezer à -18°C até o momento das análises.

#### **3.4.2.2. Determinação do teor de resíduo seco dos extratos**

A obtenção do teor de do resíduo seco dos extratos foi por processo gravimétrico, conforme AOAC (1995).

#### **3.4.2.3. Quantificação dos compostos fenólicos**

A quantificação do teor de compostos fenólicos presentes nos produtos de alho sem aditivos foi similar ao das amostras comercializadas, de acordo com o método desenvolvido por SINGLETON e ROSSI (1965), citado por NUUTILA (2003) com o reagente de Folin-Ciocalteu, conforme descrito no item 2.4.2.3. Foi utilizado como padrão o ácido gálico. Os resultados obtidos foram expressos em  $\mu\text{g/mL}$  ou  $\mu\text{g/mg}$  em relação ao resíduo seco, ambos os valores em equivalentes de ácido gálico ( $\mu\text{g/mL/EAG}$  ou  $\mu\text{g/mg/EAG}$ ).

### 3.4.2.4. Avaliação da atividade antioxidante

#### 3.4.2.4.1. Ensaio radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)

O ensaio DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) determina a capacidade das amostras em sequestrar radicais livres. O método utilizado foi descrito por YAMAGUCHI *et al.* (1998) com modificações, no qual os compostos antioxidantes reagem com o radical estável em uma solução de metanol. Assim, como descrito no capítulo 2 (item 2.4.2.4.1), a porcentagem da atividade antioxidante (% AA) foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ AA} = \frac{[(\text{abs. do branco do DPPH}) - (\text{abs. final da amostra} - \text{abs. do branco da amostra})]}{\text{abs. do branco do DPPH}}$$

onde: abs. = absorbância

Branco do DPPH = 750 µL de metanol + 1,5 mL da solução de DPPH

Branco da amostra = 750 µL da amostra + 1,5 mL de metanol

#### 3.4.2.4.2. Sistema β-caroteno/ácido linoléico

Para determinar a atividade antioxidante pelo sistema β-caroteno/ácido linoléico, foi utilizada a metodologia descrita por MARCO (1968) e modificada por MILLER (1971) empregando-se como substrato a solução de β-caroteno/ácido linoléico, de acordo com o item 2.4.2.4.2. O padrão utilizado foi o BHT. Para o cálculo da porcentagem da inibição da oxidação lipídica (% IOL) foram utilizadas as seguintes fórmulas:

$$100\% \text{ da oxidação} = \text{absorbância inicial do controle} - \text{absorbância final do controle}$$

Correlacionou-se a queda na leitura da absorvância das amostras com o controle e foi estabelecida a porcentagem de inibição da oxidação lipídica a partir da subtração da porcentagem da oxidação de cada amostra de 100, segundo a fórmula abaixo:

$$\% \text{ IOL} = 100 - \frac{(\text{absorbância inicial da amostra} - \text{absorbância final da amostra}) \times 100}{\text{absorbância inicial do controle} - \text{absorbância final do controle}}$$

#### 3.4.2.4.3. Avaliação da capacidade protetora da oxidação lipídica utilizando o aparelho Rancimat®

Um terceiro teste *in vitro* foi utilizado para avaliar a capacidade protetora das amostras estudadas. Utilizou-se o aparelho Rancimat® 743, marca *Metrohm*, conectado ao programa PC: 743 Rancimat® 1.0, onde foi medido o período de indução da gordura vegetal hidrogenada (marca Sadia) contendo o extrato metanólico, segundo o item 2.4.2.4.3. Os resultados foram expressos como Índice de Atividade Antioxidante (IAA), calculado pela fórmula:

$$\text{IAA} = \frac{\text{TI amostra}}{\text{TI controle}}$$

Onde: TI amostra = tempo de indução (h) da gordura vegetal hidrogenada + extrato contendo a amostra

TI controle = tempo de indução (h) gordura vegetal hidrogenada sem o extrato

### **3.4.2.5. Análise Estatística**

Os resultados das diferentes análises foram apresentados como média e desvio padrão.

Para comparar os produtos de alho com e sem aditivos (alho picado sem sal, com sal e misto), foi realizado o teste t-student.

Todas as análises foram realizadas em triplicata, com exceção do método utilizando o aparelho Rancimat®, onde se utilizaram amostras em duplicata. O nível de significância estabelecido para todos os testes estatísticos aplicados foi de 5%, sendo utilizado o "software" Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), versão 10.0 for Windows.

## **3.5. Resultados e Discussão**

Para a comparação dos resultados encontrados em todos os testes, utilizaram-se os valores das amostras referentes ao momento 1. Os dados sobre as amostras com aditivos estão apresentados no capítulo 2.

### **3.5.1. Teor de fenólicos totais**

Na tabela 5, nota-se que os extratos de alho picado sem sal e com sal com e sem aditivos, não apresentaram diferenças estatisticamente significante nos teores de fenólicos totais. Já o misto com aditivos apresentou menor teor de fenólicos totais, o que já era esperado, pois este produto apresentou maior teor de umidade em relação as amostras sem aditivos.

Quando quantificado os fenólicos totais em relação ao resíduo seco, todas os produtos com aditivos apresentaram menor teor destes compostos em relação ao sem aditivos. Provavelmente ocorreu uma interação entre os aditivos e os compostos fenólicos do alho. Nenhum dos aditivos presentes no alho se classifica como composto fenólico (figuras 21, 22 e 23). Além disso, o teor de fenólicos totais foi proporcional ao teor de resíduo seco.

Segundo ARAÚJO (2004) o aditivo metabisulfito reage rapidamente com vários compostos. Este aditivo é o principal composto usado na conservação de alimentos, gerando o dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>) e seus ânions bisulfito (HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>) e sulfito (SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>). As reações químicas originadas quando o dióxido de enxofre é adicionado aos alimentos são complexas, sendo convertido, principalmente, em íon bissulfito (HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Este íon pode permanecer livre e disponível para retardar a formação de compostos tipo da reação de Maillard, e pode também se ligar, reversivelmente, a certos compostos, como os grupos carbonilas de aldeídos (TAYLOR e BUSH 1987).

De acordo com CARBONELL-BARRACHINA *et al.* (2003) quando o alho *in natura* é picado ocorre a oxidação dos compostos fenólicos, formando as quinonas que apresentam coloração marrom. Os aditivos, como ácido cítrico, bisulfito de sódio, entre outros, podem retardar a oxidação dos compostos fenólicos, inibindo a formação destes compostos indesejados (quinonas). Este dado não foi observado neste estudo, ou seja, o teor de fenólicos nas amostras com aditivos não foi superior as amostras sem aditivos.

Tabela 5 – Teores médios e desvio padrão (dp) de resíduo seco e de fenólicos totais das amostras de alho com e sem aditivos.

| Alho                             | n*                  | Resíduo Seco (mg/mL) | Fenólicos totais (µg/mL/EAG**) do extrato | Fenólicos totais (µg/mg/EAG**) do extrato em relação ao resíduo seco | Nível de significância (p)*** |       |
|----------------------------------|---------------------|----------------------|---|--|-------------------------------|-------|
| <b>Alho picado (AP)</b>          | <b>com</b> aditivos | 9                    | 3,74                                      | 23,77 (1,82)   | 6,36 (0,54)                   | 0,000 |
|                                  | <b>sem</b> aditivos | 3                    | 2,46                                      | 22,11 (0,84)   | 8,97 (0,25)                   |       |
| <b>Alho picado com sal (APS)</b> | <b>com</b> aditivos | 9                    | 4,58                                      | 21,91 (1,57)   | 4,78 (0,37)                   | 0,000 |
|                                  | <b>sem</b> aditivos | 3                    | 3,73                                      | 22,86 (0,82)   | 6,13 (0,09)                   |       |
| <b>Alho misto (AM)</b>           | <b>com</b> aditivos | 9                    | 2,68                                      | 16,64 (3,73)   | 6,21 (1,10)                   | 0,005 |
|                                  | <b>sem</b> aditivos | 3                    | 2,57                                      | 21,50 (0,69)   | 8,36 (0,63)                   |       |

\* n = número de amostras.

\*\* EAG = equivalentes de ácido gálico.

\*\*\* p < 0,05 representa diferença estatisticamente significante de fenólicos totais do extrato em relação ao resíduo seco.

### 3.5.2. Avaliação da atividade antioxidante

#### 3.5.2.1. Ensaio radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)

Na tabela 6 e/ou figura do anexo 5, p. 126 estão apresentados os valores da atividade antioxidante, pelo ensaio DPPH das amostras com e sem aditivos. O AP e APS com aditivos apresentaram melhor atividade antioxidante quando comparados as mesmas amostras sem aditivos. O AM com e sem aditivos não apresentou diferença estatística.

Este resultado se justifica pela presença do ácido cítrico e do metabisulfito de sódio, aditivos empregados nas amostras, os quais atuam como antioxidante. O ácido cítrico pode apresentar sinergismo com outras substâncias que possuem ação antioxidante, conforme relatado por SILVA (2000). ASSIMOPOULOU *et al.* (2005) relataram que o ácido cítrico apresentou sinergismo com os compostos antioxidantes presentes na resina *Pistacia lentiscus*, que é um produto natural com proposta de uso farmacêutico.

Tabela 6 – Valores médios e desvio padrão (dp) da atividade antioxidante, pelo ensaio DPPH, do extrato metanólico dos diferentes produtos de alho com e sem aditivos.

| Alho                             |                     | n* | Atividade antioxidante (%) | Nível de significância (p)** |
|----------------------------------|---------------------|----|----------------------------|------------------------------|
| <b>Alho picado (AP)</b>          | <b>com aditivos</b> | 9  | 28,80 (4,11)               | 0,005                        |
|                                  | <b>sem aditivos</b> | 3  | 17,16 (0,18)               |                              |
| <b>Alho picado com sal (APS)</b> | <b>com aditivos</b> | 9  | 23,11 (1,78)               | 0,024                        |
|                                  | <b>sem aditivos</b> | 3  | 19,08 (0,43)               |                              |
| <b>Alho misto (AM)</b>           | <b>com aditivos</b> | 9  | 24,92 (4,76)               | 0,880                        |
|                                  | <b>sem aditivos</b> | 3  | 25,36 (0,22)               |                              |

\* n = número de amostras

\*\* p < 0,05 representa diferença estatisticamente significativa.

### 3.5.2.2. Sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoléico

De acordo com a tabela 7 e/ou figura do anexo 6, p. 127, verifica-se que as amostras de AP, APS e AM com a presença de aditivos, apresentaram melhor inibição da oxidação lipídica do que as amostras sem aditivos, resultados do teste t-student.

Os aditivos ácido cítrico e metabisulfito de sódio, utilizados nas amostras, atuam como antioxidante e como sinergista com outras substâncias com ação antioxidante, conforme mencionado no item 3.5.2.1.

Tabela 7 – Valores médios e desvio padrão (dp) da porcentagem de inibição da oxidação lipídica (% IOL), pelo sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico, dos produtos de alho com e sem aditivos.

| Alho                             |                     | n* | % IOL        | Nível de significância (p)** |
|----------------------------------|---------------------|----|--------------|------------------------------|
| <b>Alho picado (AP)</b>          | <b>com aditivos</b> | 9  | 34,42 (4,47) | 0,050                        |
|                                  | <b>sem aditivos</b> | 3  | 30,21 (0,56) |                              |
| <b>Alho picado com sal (APS)</b> | <b>com aditivos</b> | 9  | 38,11 (2,56) | 0,012                        |
|                                  | <b>sem aditivos</b> | 3  | 26,51 (1,56) |                              |
| <b>Alho misto (AM)</b>           | <b>com aditivos</b> | 9  | 40,94 (4,94) | 0,025                        |
|                                  | <b>sem aditivos</b> | 3  | 37,38 (1,10) |                              |

\* n = número de amostras

\*\*p < 0,05 representa diferença estatisticamente significante.

### 3.5.2.3. Avaliação da capacidade protetora da oxidação lipídica utilizando o aparelho Rancimat®

Na tabela 8 e/ou figura do anexo 7, p. 128, está apresentado o índice de atividade antioxidante das amostras com e sem aditivos. A presença do ácido cítrico e do metabisulfito de sódio foi o fator determinante nos outros dois testes, conforme mencionado nos itens 3.5.2.1 e 3.5.2.2. Verifica-se que não houve diferença entre as amostras de alho picado sem sal, com sal e misto com a adição de aditivos quando comparadas as amostras sem aditivos, pelo teste t-student. Assim, pode-se supor que

no teste utilizando o aparelho Rancimat® a presença do ácido cítrico e do metabisulfito de sódio não causou o mesmo impacto verificado nos outros dois métodos. É possível que a atuação do ácido cítrico e do metabisulfito de sódio como antioxidantes seja dependente do perfil lipídico do substrato ou das condições de oxidação do meio. No aparelho Rancimat® é utilizado a gordura vegetal hidrogenada (marca Sadia), que é rica em ácidos graxos saturados (60%), enquanto que no sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico é utilizado somente o ácido linoléico, que é um ácido graxo poliinsaturado. Além do que, no aparelho Rancimat® há um fluxo contínuo de oxigênio, enquanto que no outro método não existe. A disponibilidade de oxigênio no sistema é um fator que influencia a ligação do dióxido de enxofre. Com o oxigênio presente, parte do dióxido de enxofre pode ser oxidada, irreversivelmente, à forma sulfato, um composto único, podendo assim, ocorrer uma menor atuação deste aditivo (WEDZICHA 1992).

Tabela 8 – Valores médios e desvio padrão (dp) do índice de atividade antioxidante (IAA), medido pelo aparelho Rancimat®, dos produtos de alho com e sem aditivos.

| Alho                             |                     | n* | IAA**       | Nível de significância (p)*** |
|----------------------------------|---------------------|----|-------------|-------------------------------|
| <b>Alho picado (AP)</b>          | <b>com aditivos</b> | 6  | 1,66 (0,13) | 0,642                         |
|                                  | <b>sem aditivos</b> | 2  | 1,62 (0,08) |                               |
| <b>Alho picado com sal (APS)</b> | <b>com aditivos</b> | 6  | 1,35 (0,08) | 0,704                         |
|                                  | <b>sem aditivos</b> | 2  | 1,38 (0,13) |                               |
| <b>Alho misto (AM)</b>           | <b>com aditivos</b> | 6  | 1,39 (0,12) | 0,071                         |
|                                  | <b>sem aditivos</b> | 2  | 1,21 (0,07) |                               |

\* n = número de amostras.

\*\* IAA = tempo de indução (h) da amostra / tempo de indução (h) do controle.

\*\*\* p < 0,05 representa diferença estatisticamente significativa.

O emprego dos aditivos ácido cítrico e do metabisulfito de sódio foi importante, pois exerceu o seu efeito antioxidante e manteve a cor original do produto, uma das mais importantes características sensoriais.

### 3.6. Conclusão

- A presença de aditivos pode ter contribuído para a redução do teor de fenólicos totais do extrato em relação ao resíduo seco, através de uma possível interação destes aditivos com os fenólicos;
- A presença dos aditivos ácido cítrico e metabisulfito de sódio contribuíram de modo significativo para o efeito antioxidante nos ensaios DPPH e no sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico, o que não ocorreu no método utilizando o aparelho Rancimat, possivelmente em função dos diferentes perfis lipídicos dos substratos e diferentes condições metodológicas.

## Referências bibliográficas\*

Abdalla DSP. **Antioxidantes: conceitos básicos e perspectivas terapêuticas**. ARS Curandi 1993; 26: 141-64.

Abdalla DSP. Estresse oxidativo e alimentação. *In*: Tirapegui J (ed) **Nutrição: Fundamentos e aspectos atuais**. São Paulo; Atheneu, 2000; 179-200.

Amaral LFAL, Huachaca NSM, Vicente SJV. Antioxidantes em Alimentos – Legislação Brasileira. *In*: Torres EAFS ed. **Alimentos do Milênio**. São Paulo; Signus, 2002.

Amorim JRA, Fernandes PD, Gheyl HR, Azevedo NC. Efeito da salinidade e modo de irrigação no crescimento e produção de alho. **Pesq Agropec Bras** 2002; 37(2): 167-76.

Antolovich M, Prenzler PD, Patsalides E, McDonald S, Robards K. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst** 2002; 127: 186-98.

[ANVISA] Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC-276, de 22/09/05: dispõe sobre regulamento técnico para especiarias, temperos e molhos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 23/06/05.

[AOAC] Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. 16<sup>a</sup> ed. Arlington; 1995.

Araújo JMA. **Química de alimentos**. 3<sup>a</sup> ed. Viçosa: UFV; 2004. Conservantes químicos; p. 229-48.

---

\* De acordo com as normas do Guia de apresentação de Teses. Biblioteca/CIR – Centro de Informação e Referência em Saúde Pública. São Paulo; 1998.

Assimopoulou NA, Zlatanov SN, Papageorgiou VP. Antioxidant activity of natural resins and bioactive triterpenes in oil substrates. **Food Chem** 2005; 92: 721-27.

Auger J, Yang W, Arnault I, Pannier F, Potin-Gautier. High-performance liquid chromatographic-inductively coupled plasma mass spectrometric evidence for Se-“allins” in garlic and onion grown in Se-rich soil. **J Chromatography A** 2004; 1032: 103-7.

Baghalian K, Ziai SA, Naghavi MR, Badi HN, Khalighi A. Evaluation of allicin content and botanical traits in Iranian garlic (*Allium sativum* L.) ecotypes. **Scientia Horticulturae** 2005; 103(2): 155-166.

Barrera P, Camargo CD. O alho: uma planta mágica com o futuro garantido no mercado nacional. (2 ed.) São Paulo; Cone, 1985; 7-98.

Baruffaldi R, Oliveira MN. **Fundamentos de Tecnologia de alimentos**. São Paulo: Atheneu; 1998. Uso de aditivos; v. 3, p. 153-90.

Bast A, Haenen GRMM, Doelman CJA. Oxidants and antioxidants: state of the art. **Am J Med** 1991; 91(suppl 3C):3S-13S.

Bastos DHM, Ishimoto EY, Marques MOM, Ferri AF, Torres EAFS. Essential oil and antioxidant activity of green mate and mate tea (*Ilex paraguariensis*) infusions. **J Food Composition Analysis** (in press).

Benkeblia N. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). **Lebensm-Wiss Technol** 2004; 37: 263-8.

Benkeblia N. Free-radical scavenging capacity and antioxidant properties of some selected onions (*Allium cepa* L.) and garlic (*Allium sativum* L.) extracts. **Brazilian Arch of Biol and Techn** 2005; 48(5): 753-59.

Berbari SAG, Silveira NFA, Oliveira LAT. Avaliação do comportamento de pasta de alho durante o armazenamento (*Allium sativum* L.). **Ciênc Tecnol Aliment** 2003; 23(3): 468-72.

Berthold HK, Sudhop T, Von Bergmann K. Effects of a garlic oil preparation on serum lipoproteins and cholesterol metabolism. **JAMA** 1998; 279: 1900-02.

Bilyk A e Sapers GM. Distribution of quercetin and kamempferol in lettuce, kale, chive, garlic chive, leek, horseradish, red radish and red cabbage tissues. **J Agric Food Chem** 1985; 33: 226-28.

Block E. The chemistry of garlic and onions. **Sci Am** 1985; 252: 114-9.

Block E. the organosulfur chemistry of the genus *Allium* – implications for the organic chemistry of sulfur. **Angew Chem In E Engl** 1992; 31: 1135-78.

Bobbio PA, Bobbio FO. **Química do processamento de alimentos**. 2<sup>a</sup> ed. São Paulo:Varela; 1995. Aditivos, p. 133-35.

Bobbio PA, Bobbio FO. **Carboidratos**. In: Química do processamento dos alimentos. São Paulo; Varela, 2001; 47-60.

Bocco A, Cuvelier ME, Richard H, Berset C. Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. **J Agric Food Chem** 1998; 46: 2123-29.

Borex C. Antioxidant health effects of aged garlic extract: Recent advances on the nutritional effects associated with the use of garlic as supplement. **The J Nutr** 2001; 131(3S): 1010-5.

Brand-Willians W, cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technol** 1995; 28: 25-30.

Brasil. Resolução - CNVS nº 04/88, de 24 de novembro de 1988, publicada no Diário Oficial da União de 19 de dezembro de 1988.

Camougrand N, Rigoulet M. Aging and oxidative stress: studies of some genes involved both in aging and in response to oxidative stress. **Respiration Physiology** 2001; 128: 393-401.

Carbonell-Barrachina AA, Zaragoza MP, Lario Y, Aracil P, Burló F. Development of a high sensory quality garlic paste. **J Food Science** 2003; 68(7): 2351-55.

Carvalho VD, Souza SMC, Abreu CMP, Chagas SJR. Tempo de armazenamento e qualidade do alho, cv. Amaranthe. **Pes Agrop Bras** 1991; 26(10): 1679-84.

Cheng TY, Zhu Z, Masuda S, Marcos NC. Effects of multinutrient supplementation on antioxidant defense systems in healthy human beings. **J Nutr Biochemistry** 2001; 12: 388-95.

Coultate TP. **Conservantes**. 3<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Artmed; 2004. Alimentos: a química de seus componentes; p. 249-66.

Daglia M, Papetti A, Gregotti C, Berte F, Gazzani G. *In vitro* antioxidant and *ex vivo* protective activities of green and roasted coffee. **J Agric Food Chem** 2000; 48: 1449-54.

Diplock AT, Charleux G, Willi-Crozier G, Kok FJ, Evans-Rice C, Roberfroid M, Stahl W, Ribes-Vinã J. Functional food science and defense against reactive oxidative species. **British J Nutr** 1998; 80(suppl 1): S77-S112.

Donnelly JK, Robson DS. Free radical in foods. **Free radical Res** 1995; 22(2):147-76.

Dorko C. Antioxidants used in foods. **Food Technol** 1994, 33.

Dreosti JE. Antioxidant polyphenols in tea, cocoa, and wine. **Nutrition** 2000; 16(6/7); 692-94.

Durak I, kavutcu M, Aytac B, Avci A, Devrim E, Ozbeck H, Ozturk S. Effects of garlic extract consumption on blond lipid and oxidant/antioxidant parameters in humans with high blood cholesterol. **J Nutr Biochem** 2004; 15: 373-77.

Egen-Schwind C, Eckard R, Kemper FH. Metabolism of garlic constituents in the isolated perfusing rat liver. **Planta Med** 1992; 58: 301-5.

Ellmore GS, Feldberg RS. Alliinlyase localixation in the bundle sheats of the garlic clove (*Allium sativum*). **Am J Bot** 1994; 81: 89-94.

Embrapa - Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. Controle de qualidade de produção de alho-semente da cultivar amarante por meio de marcadores RAPD. Agosto de 2004; ISSN 1676 – 1340.

Esterbauer H, Gebicki J, puhl H, Gunther J. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. **Free Radical Biol Med** 1992; 13(4): 341-90.

Fagundes AF, Ayub RA. Caracterização físico-química de caquis cv. Fuyu submetidos à aplicação de agentes inibidores de escurecimento e armazenamento a 0°C. **Acta Sci Agron** 2005; 27(3): 403-08.

[FAO] - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Faostats - FAO Statistical Databases** Disponível em: <http://apps.fao.org> Acesso em: 15 Mar. 2005.

[FCF/USP] Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental. Qualidade em informações sobre alimentos brasileiros. Available at <<http://www.fcf.usp.br/tabela/resultado.asp?IDLetter=B&IDNumber=123>> (02 fev 2006).

Fenwick GR, Hanley AB. Genus Allium. **Crit Ver Food Sci Nutr** 1985; 22: 199-377.

Fernández-López J, Zhi N, Aleson-Carbonell L, Pérez-Alvarez JA, Kuri V. Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meat balls. **Meat Science** 2005; 69: 371-80.

Ferrari CKB. Oxidação lipídica em alimentos e sistemas biológicos: mecanismos gerais e implicações nutricionais e patológicos. **Rev Nutr Campinas** 1998; 11(1): 3-14.

Ferrari CKB. Fatores bioquímicos e físicos pró e antioxidantes, relacionados à oxidação lipídica em alimentos. **Hig Aliment** 2000; 14 (78/79): 37-44.

Ferrari CKB, Torres EAFS. Fatores físicos e bioquímicos da industrialização, preparo e armazenamento de alimentos e sua relação com radicais livres e a oxidação lipídica em alimentos. **Hig Aliment** 2000; 14(68/69): 19-25.

Ferrari CK. Avaliação da capacidade antioxidante total (CAT) e colorimetria de vinte e um diferentes tipos de alimentos comercializados no município de São Paulo (SP), Brasil. São Paulo, 2002. [Tese de Doutorado - Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo/USP].

Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Ver Ass Med Brasil** 1997; 43(1): 61-8.

Gazzani G, Papetti A, Dagnas M, Berté F, Gregotti C. Protective activity of water soluble components of some common diet vegetables on rat liver microsomes and the effect of thermal treatment. **J Agric Food Chem** 1998; 46: 4123-27.

Giada MLR, Mancini-Filho J. The *in vitro* antioxidant activity of food phenolic compounds. **Nutrire** 2004; 28: 91-107.

Gray JI. Measurement of lipid oxidation: a review. **J Am Oil Chem Soc** 1978; 55:539-46.

Guerra NB, Lajolo FM. Ação antioxidante de especiarias face diferentes atividades de água. **Ciênc tecnol Aliment** 2005; 25(1): 45-50.

Halladay SC, Ryerson BA, Smith CR, Brown JP, Parkinson TM. Comparison of effects of dietary administration of butylated hydroxitoluene or a polymeric antioxidant on the hepatic and intestinal cytochrome P-450 mixed-function-oxygenase system of rats. **Food Cosm Toxicol** 1980; 18(6): 569-70.

Halliwell B, Gutteridge JMC. **Free radical in medicine and biology**. London; Claredon Press 1989; 543.

Halliwell B, Murcia MA, Chirico S, Aruoma OI. Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work. **Crit Rev Food Sci Nutr** 1995; 35(172): 7-20.

Hasenhuetti GL, Wan PJ. Temperature effects on the determination of oxidative stability with the Metrohm Rancimat. **J Am Oil Chem Soc** 1992; 69(6): 525-27.

Hirata R, Matsushita S. Reducing activity level of alliin. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry** 1996; 60: 484-85.

Holub BJ, Arnott K, Davis J-P, Nagpurkar A, Peschell J. Organosulfur compounds from garlic. *In*: Shi J, Mazza G, Maguer M L (ed) **Functional Foods**. Washington; CRC, 2002; (2): 213-79.

Hoog N, Darley-Usmar VM, Wilson MT, Moncada S. Production of hydroxyl radicals from the simultaneous generation of superoxide and nitric oxide. **Biochem J** 1992; 281: 419-24.

Isaacshon, J.L., Moser, M., Stein, E.A., Dudley, K., Davey, J.A., Liskov, E., Black, H.R. Garlic powder and plasma lipids and lipoproteins: A multicenter, randomized, placebo-controlled trial. **Arch Int Med** 1998; 158: 1189-94.

Ishimoto EY. Atividade antioxidante *in vitro* em vinhos e sucos de uva. São Paulo, 2003. [Dissertação de Mestrado - Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo/USP].

Iuliano L, Colavita AR, Leo R, Pratico D, Violi F. Oxygen free radicals and platelet activation. **Free Radical Biol Med** 1997; 22: 999-1006.

Kaur C, Kapoor HC. Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium's health. **Int J Food Sci and Techn** 2001; 36: 703-25.

Kaur C, Kapoor HC. Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. **Inter J Food Sci and Techn** 2002; 37: 153-61.

Khosla P, Karan RS, Bhargava VK. Effect of garlic oil on ethanol induced gastric ulcers in rats. **Phytother** 2004; 18: 87-91.

Kim SM, Kubota K, Kobayashi A. Antioxidant activity of sulfur-containing flavor compounds in garlic. **Bioscience, Biotechnolgy and Biochemistry** 1997; 61: 1482-85.

Kim JC, Seong-Ho K, Lee YJ, Lee KY, Kim Y, Kim S, Lee M-K, Kim SH. Differential effects of diallyl disulfide on neuronal cells depend on its concentration. **Toxicology** 2005; 211: 86-96.

Kirk JR. Biological availability of nutrients in processed foods. **J Chem Educ** 1984; 61(4): 364-7.

Krest I, Keusgen M. Quality of herbal remedies from *Allium sativum*; differences between garlic powder and fresh garlic. **Plant Med** 1999; 65(2):139-43.

Kris-Etherton PM, Hecker KD, Bonanome A, Coval SM, Binkoski AE, Hilpert KF, Griel AE, Etherton TD. Bioactive Compounds in Foods: Their Role in the Prevention of Cardiovascular Disease and Cancer. **The American Journal Medicine** 2002; 113 (9B): 71-88.

Kulisic T, Radonic A, Katalinic V, Milos A. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. **Food Chem** 2004; 85: 633-40.

Kwak NS, Jukes DJ. Functional foods. The development of a regulatory concept. **Food Control** 2001; 12: 99-107.

Lampe JW. Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies. **American J clinical Nutr** 1999; 70: 475-90.

Lanzotti V. The analysis of onion and garlic. **J Chromat** 2006; in press.

Laubli MW, Bruttel PA. Determination of the oxidative stability of fats and oils: comparison between the active oxygen method (AOCS Cd 12-57) and the Rancimat Method. **J Am Oil Chem Soc** 1996; 63(6): 792-95.

Lawson LD. Bioactive organosulfur compounds of garlic and garlic products: Role in reducing blood lipids. In: **Human Medicinal Agents from Plants**. American Chemical Society, Washington, DC 1993; 306-30.

Lawson LD. Garlic: a review of its medical effects and indicated active compounds. In: Lawson LD, Bauer R (eds), **Phytomedicines of Europe: chemistry and biological activity**, ACS Symposium Series, Washington, DC: American Chemical Society 1998; 691: 176-209.

Lindsay RC. Aditivos alimentarios. In: Fennema OR. **Química de los alimentos**. Espanã: Acribia, 1993. p. 709-73.

Loliger J. The use of antioxidant in food. *In*: Aruoma OI, Halliwell B. **Free radicals and food additives** 1991; 121-50.

Mancini-Filho J, Van-Koij A, Mancini, DAP, Cozzolino FF, Torres RP. Antioxidant activity of cinnamon (*Cinnamomum Zeylanicum*, *Breyne*) extracts. *Boll. Chim Farmac* 1998; 137(11): 443-7.

Manzocco L, calligaris S, Mastrocola D, Nicolo MC, Lericri CR. Review of non-enzymatic browning and antioxidant capacity in processed foods. **Trens in Food Science & Technol** 2001; 11: 340-46.

Marco CJ. A Simplified method for the evaluation of antioxidants. **J Am Oil Chem Soc** 1968; 45: 594.

Marouelli WA, Silva WLC, Carrijo OA, Silva HR. Produção e qualidade de alho sob regimes de água no solo e doses de nitrogênio. **Hort Bras** 2002; 20(2): 191-94.

Martin AD, Gilbert D. Enzyme changes accompanying liver enlargement in rats treated with 3-terbutyl-4-hydroxyanisole. **Biochem J** 1968; 106:22.

Martinez-Valverde I, Periago MJ, Ros G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. **Archivos Latamericanos de Nut** 2000; 50(1): 5-18.

McCrinkle BW, Helden E, Conner WT. Garlic extract therapy in children with hypercholesterolemia. **Arc Pediatr Adolesc Med** 1998; 152: 1089-94.

Melo MSON, Graças VLB, Mancini Filho J. Atividade antioxidante de condimentos. Congresso da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, IX, Curitiba –PR. Resumos 1986; 56.

Melo MSOM, Mancini-Filho J. Antioxidantes naturais do fruto do dendezeiro (*Elaeis guineensis*, Jaq). **Rev Farm Bioq Univ São Paulo** 1989; 25(2): 147-57.

Melo EA, Mancini-Filho J, Guerra NB, Maciel GR. Atividade antioxidante de extratos de coentro (*Coriandrum sativum* L.). **Ciênc Tecnol Aliment** 2003; 23(supl): 195-99.

Meneghini R. Genotoxicity of active oxygen species in mammalian cells. **Mutat Res** 1988; 195: 215-30.

Menezes Sobrinho, JA, Lopes CA, Reifschneider FJB, Charchar JM, Crisóstomo LA, Carrijo OA, Barbosa S. Alho. Coleção Plantar – EMBRAPA, 1993.

Miller HE. A simplified method for the evaluation of antioxidants. **J Am Oil Chem Soc** 1971; 48: 91.

Miller HE, Rigelhof F, marquart L, Prakash A, Kanter M. Antioxidant content of whole grain breakfast cereals, fruits and vegetables. **J American College Nutr** 2000; 19: 1-8.

Milner JA. Functional foods and health promotion. **J Nutr** 1999; 129: 1395-7.

Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **N Engl J Med** 1993; 329: 2002-20.

Morales FJ, Babbel MBJ. Melanoidins exert a weak antiradical activity in watery fluids. **Agric Food Chem** 2002; 50(16): 4657-61.

Moreira AVB, Mancini-Filho J. Efeito dos compostos fenólicos de especiarias sobre lípidos poliinsaturados (TALNO4). **Rev Bras Ciências Farmac** 2003; 39: 130-33.

Moreira AVB, Mancini-Filho J. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. **Rev Nutr** 2004; 17(4): 411-24.

Morris J, Burke V, Mori TA. Effects of garlic extract on platelet aggregation: a randomized placebo-controlled double-blind study. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology** 1995; 22: 414-417.

Moure A, Cruz JM, Franco D, Domínguez JM, Sineiro J, Domínguez H, Núñez MJ, Parajó JC. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chem** 2001; 72: 145-71.

Murcia MA, Egea I, Romojaro F, Parras P, Jimenez AM, Martinez-Tome M. Antioxidant evaluation in dessert spices compared with common food additives. Influence of irradiation procedure. **J Agric food Chem** 2004; 52(7): 1872-81.

Namiki M. Antioxidants/antimutagens in food. **Crit Rev Food Sci Nutr** 1990; 29: 273-300.

Nawar WW. Lipids. In: Fennema OR (Ed) **Food Chemistry**. New York: Marcel Dekker, Inc. 1996; 49: 653-67.

Nicoli MC, Anese M, Parpinel NT. Loss and/or formation of antioxidants during food processing and storage. **Cancer Lett** 1997; 114: 71-4.

Nicoli MC, Anese M, Parpinel NT. Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables. **Trens Food Sci Technol** 1999; 10: 94-100.

Neter J, Kutner MH, Nachtsheim CJ, Wasserman W. **Applied linear statistical models**. 4<sup>th</sup> ed. Boston:Irwin, 1996.

Nuutila AM, Puupponen-Pimia R, Aarni M, Oksman-Caldentey K-M. Comparison of antioxidant activities of onion and garlic extracts by inhibition of lipid peroxidation and radical scavenging activity. **Food Chemistry** 2003; 81: 485-93.

Oliveira CM, Souza RJ, Mota JH. Determination of the harvest date for garlic cultivars. **Horticultura Brasileira** 2003; 21(3): 506-509.

Oliveira CM, SOUZA RJ, YURI JE. Harvest date and storage potential in garlic cultivars. **Horticultura Brasileira** 2004; 22(4): 804-807.

Parejo I, Viladomat F, bastida J, Rosas-Romero A, Saavedra G, Murcia MA, Jiménez M, Codina C. Investigation of Bolivian plant extracts for their radical scavenging activity and antioxidant activity. *Life Science* 2003; 73: 1667-81.

Parras RGC, Duailibi SR. Uso dos alimentos funcionais: Os principais e as quantidades necessárias para se obter o apelo de saudabilidade. In: Torres EAFS ed. **Alimentos do Milênio**. São Paulo; Signus, 2002.

Polidori MC, Stahl W, Eichler O, Niestroj I, Sies H. Profiles of antioxidants in human plasma. **Free radical Biology & Medicine** 2001; 30: 456-62.

Popolim WD. Estimativa da ingestão de sulfitos pela análise qualitativa da dieta. São Paulo, 2004. [Dissertação de Mestrado – PRONUT – Faculdade de Ciências Farmacêuticas / Faculdade de Economia Administração e Contabilidade / Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo/USP].

Pratt DE. Natural antioxidants from plant material. *In*: Huang MT, Ho CT, Lee CY. (ed) **Phenolic compounds in food and their effects on health II**. Washington; American Chemical Society 1992; 54-71.

Prior RL, Cao G, Inglett G. Antioxidant content of cereal grain ingredients and commercial breakfast cereals. **Am Chem Soc** 1998; 216: 119.

Prior RL, Cao G. Analysis of botanicals and dietary supplements for antioxidant capacity: A review. **J of AOAC Int** 2000; 83(4): 950-56.

Pulido R, Bravo L, Saura-Calixto F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **J Agric Food Chem** 2000; 48: 3396-402.

Radi R, Berckman JS, Freeman BA. Peroxynitrite oxidation of sphydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. **J Biol Chem** 1991; 266: 4244-50.

Rios MG, Penteadó MDVC. Determinação de  $\alpha$ -tocoferolem alho irradiado utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). **Quím Nova** 2003; 26(1): 10-2.

Saldanha LA. Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* de extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) verde e tostada e chá verde (*Camellia sinensis*). São Paulo, 2005. [Dissertação de Mestrado - Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo/USP].

Shahidi F, Wanasundara PKJPD. Phenolic antioxidants. **Crit Ver Food Sci Nutr**. 1992; 32(1): 67-103.

Sies H. What is oxidative stress? *In*: Keaney JF. **Oxidative stress and vascular disease**. Kluwer Academic Publishers 2000.

Silagy C, Neil A. garlic as a lipid lowering agent – a meta-analysis. **J R Coll Physiclans Lond** 1994; 28(1): 39-45.

Silva FA, Borges MFM, Ferreira MA. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova** 1999; 22(1): 94-103.

Silva JA. **Tópicos da tecnologia dos alimentos**. São Paulo: Varela; 2000. Utilização de aditivos na produção e conservação dos alimentos; p. 215-27.

Simic MG, Javanovic SVI. Activation of oxygen radicals by dietary phenolic compounds in anticarcinogenesis. *In*: Ho CT, Osawa T, Huang MT, Rosen RT (eds) **Food phytochemicals for cancer prevention I**. Washington: ACS 1994: 20-33.

Sineiro J, Dominguez H, Núñez MJ. Compuestos polifenólicos de la harina de girassol: implicaciones tecnológicas y nutricionales. **Alimentaria** 1989; 97: 89-94.

Sing G, Damacesno DD, D'Andréa ED, Silva GA. Efeitos agudos dos extratos hidroalcoólicos do alho (*Allium sativum* L.) e do capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC) Satpf) sobre a pressão arterial média de ratos anestesiados. **Rev Bras Farmacognosia** 2005; 15(2): 94-7.

Singleton VL, Rossi Jr JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **Am J Enol Vitic** 1965; 16: 144-58.

Souza RJ, Macedo FS. Vernalização de cultivares de alho nobre na região de Lavras. **Horticultura Bras** 2004; 22(3): 651-54.

Steiner M, Khan AH, Holbert D, Lin RI. A double-blind crossover study in moderately hypercholesterolemic men that compared the effect of aged garlic extract and placebo administration on blood lipids. **Am J Clin Nutr** 1996; 64:866-70.

Sun T, Ho C-T. Antioxidant activities of buckwheat extracts. **Food Chem** 2005; 90: 743-49.

Taylor SL, Bush RK. Sulfites as food ingredients. **Food Technol** 1987; 39(11): 532-36.

Tfouni SAV, Toledo MCF. Determination of benzoic and sorbic acids in Brazilian food. **Food Control** 2002; 13: 117-23.

Thomas MJ. The role of free radicals and antioxidants. **Nutrition** 2000; 16 (7/8): 16-8.

Torres EAFS. Oxidação lipídica em charque. São Paulo, 1987. [Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo/USP].

Torres E, Pearson AM, Gray JI, Booren AM, Shimokomaki M. Effect of salt on oxidative changes in pre and post-rigor ground beef. **Meat Sci** 1988; 23: 151-63.

Tsai T-H, Tsai P-J, Ho S-C. Antioxidant and anti-inflammatory activities of several commonly used spices. **J Food Science** 2005; 70(1): 93-97.

[USDA] National Nutrient Database for Standard Reference, Release 14 (Julho 2001) <http://www.unifesp.br/dis/servicos/nutri/nutri.php?id=2651> (08 fev 2006).

Vinson JA, Hao YH, Su X, Zubik L. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: vegetables. **J Agric Food Chem** 1998; 46: 3630-34.

Yamaguchi T, Takamura H, Matoba T, Terao J. HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry** 1998; 62: 1201-04.

Yin M, Cheng W. Antioxidant activity of several *Allium* members. **J Agric Food Chem** 1998; 46: 4097-4101.

Yin M-C, Hwang S-W, Chan K-C. Nonenzymatic activity of four organosulfur compounds derived from garlic. **J. Agric and Food Chem** 2002; 50: 6143-47.

Wanasundara PKJPD, Shahidi F, Shukla VKS. Endogenous antioxidants from oil seeds and edible oils. **Food Rev Int** 1997; 13(2): 225-92.

Warshafsky S, Kamer RS, Sivak SL. Effect of garlic on total serum cholesterol. A meta-analysis. **Ann Int Med** 1993; 119(7 Pt 1): 599-605.

Wedzicha BL. Chemistry of sulphiting agents in food. **Food Addit Contam** 1992; 9(5): 449-59.

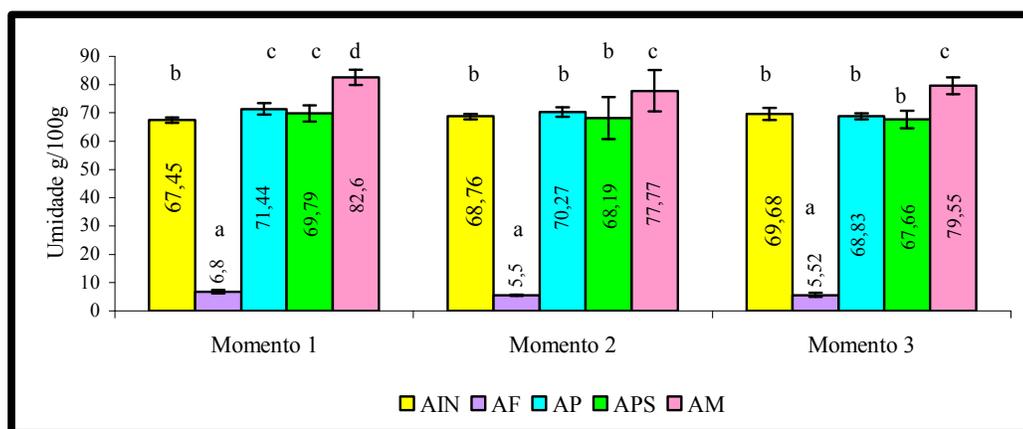
Wettasinghe M, bolling B, Plahak L, Parkin K. Screening for phase II enzyme-inducing and antioxidant activities of common vegetables. **J Fod Science** 2002; 67(7): 2583-87.

## ANEXO 1

### Determinação do teor de umidade das amostras comercializadas de alho.

A determinação de umidade foi realizada por processo gravimétrico, o qual se baseia na determinação da perda de peso da amostra submetida ao aquecimento em estufa a 105 °C, resultando na amostra seca ou dessecada. A pesagem foi realizada após resfriamento em dessecador, sendo a operação repetida até peso constante (AOAC 1995).

A umidade média do **momento 1** (análise próxima à data de fabricação), do **momento 2** (análise no período intermediário entre a fabricação e a validade) e do **momento 3** (análise próxima ao fim da data de validade), estão apresentadas na figura abaixo.



\* n = número de amostras

Letras diferentes no mesmo momento indicam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

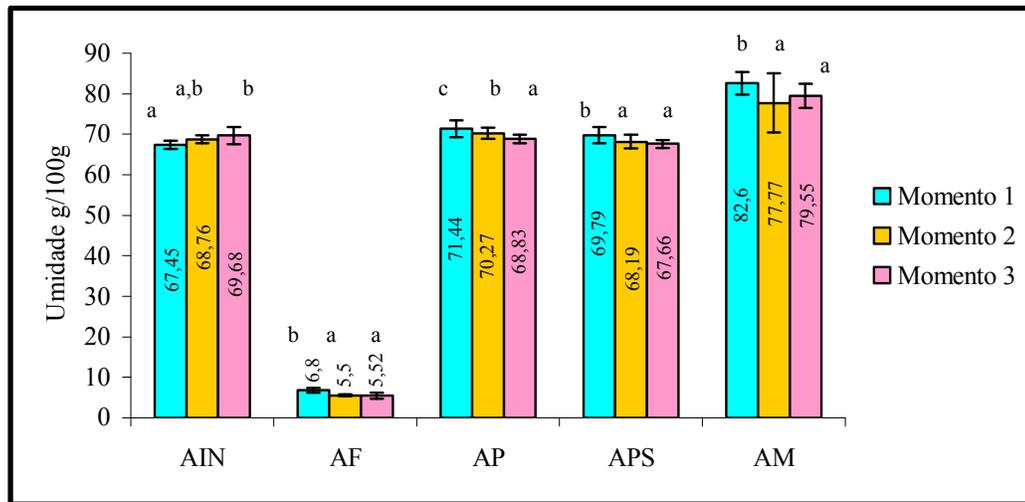
Figura – Teor de umidade do alho *in natura* e de seus produtos comercializados dos momentos 1, 2 e 3 ( $n^* = 9$ ).

Pode-se constatar pela análise de variância que existe diferença estatisticamente significativa entre as amostras de alho *in natura* e seus produtos comercializados nos três momentos. O alho frito apresentou menor teor de umidade em todos os momentos, quando comparado com o alho *in natura* e os demais

produtos ( $p < 0,001$ ), e o contrário ocorreu com o alho misto. Como esperado, as amostras de alho misto em todos os momentos apresentaram valores superiores de umidade do que as demais amostras, justificado pelo fato de que este produto é uma mistura de alho desidratado com *in natura*, conforme mencionado anteriormente. Para ocorrer o processamento deste produto é necessário a adição de água. Comparando o alho picado sem sal e o picado com sal, em todos os momentos da vida de prateleira, pode-se dizer que não há diferença entre estas amostras.

De acordo com as tabelas de composição de alimentos do USDA (2001) e da FCF/USP (2006) o teor de umidade para o alho *in natura* cru é de 58,58 e 65,51 g/100g respectivamente, enquanto que no presente estudo, este dado variou de 67,45 a 69,68 g/100g, ao longo da vida de prateleira. Esta diferença pode se justificar em função das variações climáticas, solo, tipos de alho, técnicas de manuseio, período de cura e armazenamento pós-colheita, conforme citado por CARVALHO *et al.* (1991) e por RIOS e PENTEADO (2003). HOLUB *et al.* (2002) relataram que o alho *in natura* possui em média de 56 a 68 g/100g de umidade.

Com base nos resultados encontrados na próxima figura, verifica-se uma tendência em diminuir o teor de umidade das amostras de AF, AP, APS e AM no decorrer da vida de prateleira, porém o contrário ocorreu com o AIN, para o qual se observou um pequeno incremento de umidade significativa. Alguns estudos verificaram que houve perda de peso e alterações na composição química dos bulbos de alho no decorrer do armazenamento (CARVALHO *et al.* 1991; RIOS e PENTEADO 2003), porém este fato não aconteceu com o alho *in natura* nas condições de armazenamento do presente estudo.



AIN = alho *in natura*; AF = alho frito; AP = alho picado sem sal; APS = alho picado com sal; AM = alho misto  
 Letras diferentes na mesma amostra indicam diferença estatisticamente significante ( $p < 0,05$ ).

Figura – Teor de umidade do alho *in natura* e de seus produtos comercializados no decorrer da vida de prateleira.

## ANEXO 2

Tabela – Valores médios e desvio padrão (dp) da atividade antioxidante, pelo ensaio DPPH, do extrato metanólico do alho *in natura* e de seus produtos comercializados dos momentos 1, 2 e 3 (n\* = 9).

| Alho                               | % Atividade antioxidante      |                             |                             |
|------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
|                                    | Momento 1                     | Momento 2                   | Momento 3                   |
| <b>Alho <i>in natura</i> (AIN)</b> | 21,69 <sup>a a</sup> (3,22)   | 19,78 <sup>b a</sup> (6,95) | 21,68 <sup>b a</sup> (1,76) |
| <b>Alho frito (AF)</b>             | 60,85 <sup>c a</sup> (6,03)   | 46,04 <sup>c b</sup> (3,60) | 49,83 <sup>c b</sup> (1,23) |
| <b>Alho picado sem sal (AP)</b>    | 28,80 <sup>b a</sup> (4,11)   | 5,63 <sup>a b</sup> (0,45)  | 7,30 <sup>a b</sup> (0,98)  |
| <b>Alho picado com sal (APS)</b>   | 23,11 <sup>a a</sup> (1,78)   | 6,87 <sup>a b</sup> (0,54)  | 7,76 <sup>a b</sup> (1,23)  |
| <b>Alho misto (AM)</b>             | 24,92 <sup>a,b a</sup> (4,76) | 9,04 <sup>a b</sup> (3,42)  | 9,57 <sup>a b</sup> (0,86)  |

\* n = número de amostras.

Letras diferentes na mesma **coluna** indicam diferença estatisticamente significante (p < 0,05).

Letras diferentes em **negrito** na mesma **linha** indicam diferença estatisticamente significante (p < 0,05).

## ANEXO 3

Tabela – Valores médios e desvio padrão (dp) da inibição da oxidação lipídica (IOL), pelo sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico, do extrato metanólico do alho *in natura* e de seus produtos comercializados dos momentos 1, 2 e 3 ( $n^* = 9$ ).

| Alho                                       | % IOL                                    |                             |                              |
|--|--|-----------------------------|------------------------------|
|  | Momento 1                                | Momento 2                   | Momento 3                    |
| <b>Alho <i>in natura</i> – bulbo (AIN)</b> | 35,74 <sup>a,b</sup> <sup>a</sup> (3,65) | 39,84 <sup>a,b</sup> (2,12) | 44,97 <sup>a,c</sup> (2,06)  |
| <b>Alho frito (AF)</b>                     | 79,09 <sup>c</sup> <sup>a</sup> (2,97)   | 85,49 <sup>d,b</sup> (0,87) | 78,03 <sup>c,a</sup> (3,20)  |
| <b>Alho picado sem sal (AP)</b>            | 34,42 <sup>a,a</sup> (4,47)              | 65,14 <sup>b,b</sup> (3,13) | 68,16 <sup>b,b</sup> (13,62) |
| <b>Alho picado com sal (APS)</b>           | 38,11 <sup>a,b</sup> <sup>a</sup> (2,56) | 69,85 <sup>c,b</sup> (3,08) | 78,82 <sup>c,c</sup> (7,07)  |
| <b>Alho misto (AM)</b>                     | 40,94 <sup>b</sup> <sup>a</sup> (4,94)   | 72,03 <sup>c,b</sup> (4,26) | 82,25 <sup>c,c</sup> (5,18)  |

\* n = número de amostras.

Letras diferentes na mesma **coluna** indicam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

Letras diferentes em **negrito** na mesma **linha** indicam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

## ANEXO 4

Tabela – Valores médios e desvio padrão (dp) do índice de atividade antioxidante (IAA), utilizando o aparelho Rancimat, do extrato metanólico do alho *in natura* e de seus produtos comercializados dos momentos 1, 2 e 3 ( $n^* = 6$ ).

| Alho                                       | IAA**                         |                                  |                               |
|--|-------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|
|  | Momento 1                     | Momento 2                        | Momento 3                     |
| <b>Alho <i>in natura</i> – bulbo (AIN)</b> | 1,35 <sup>a a</sup> (0,19)    | 1,41 <sup>a, b a</sup> (0,06)    | 1,54 <sup>a, b a</sup> (0,23) |
| <b>Alho frito (AF)</b>                     | 1,60 <sup>b, c a</sup> (0,19) | 1,63 <sup>b a</sup> (0,19)       | 1,67 <sup>b a</sup> (0,15)    |
| <b>Alho picado sem sal (AP)</b>            | 1,66 <sup>c a</sup> (0,13)    | 1,57 <sup>a, b a</sup> (0,10)    | 1,64 <sup>a, b a</sup> (0,23) |
| <b>Alho picado com sal (APS)</b>           | 1,35 <sup>a a</sup> (0,08)    | 1,35 <sup>a a</sup> (0,16)       | 1,43 <sup>a a</sup> (0,16)    |
| <b>Alho misto (AM)</b>                     | 1,39 <sup>a, b a</sup> (0,12) | 1,50 <sup>a, b a, b</sup> (0,17) | 1,64 <sup>a, b b</sup> (0,08) |

\* n = número de amostras

\*\* IAA = tempo de indução (h) da amostra / tempo de indução (h) do controle

Letras diferentes na mesma **coluna** indicam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

Letras diferentes em **negrito** na mesma **linha** indicam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

## ANEXO 5

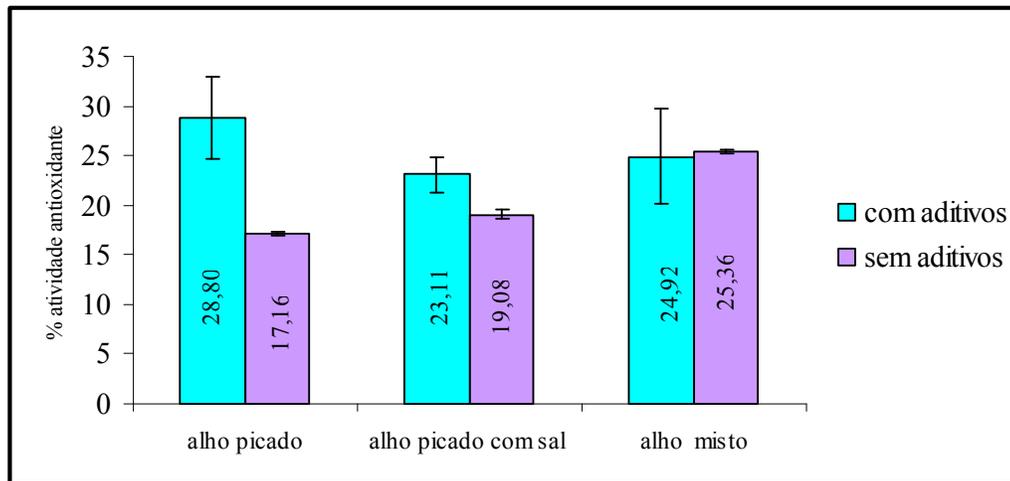


Figura – Atividade antioxidante, pelo ensaio DPPH, do extrato metanólico dos diferentes produtos de alho com e sem aditivos.

## ANEXO 6

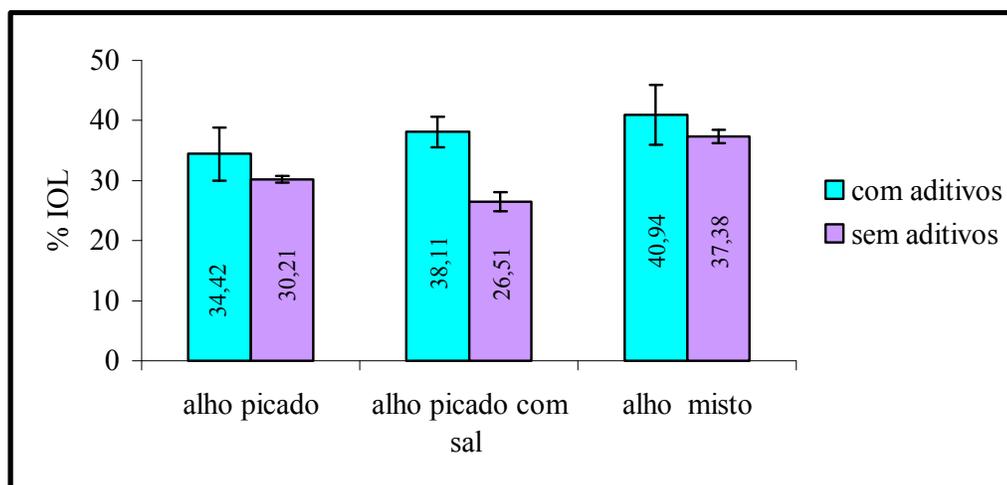


Figura – Porcentagem de inibição da oxidação lipídica (% IOL), pelo sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico, dos produtos de alho com e sem aditivos.

## ANEXO 7

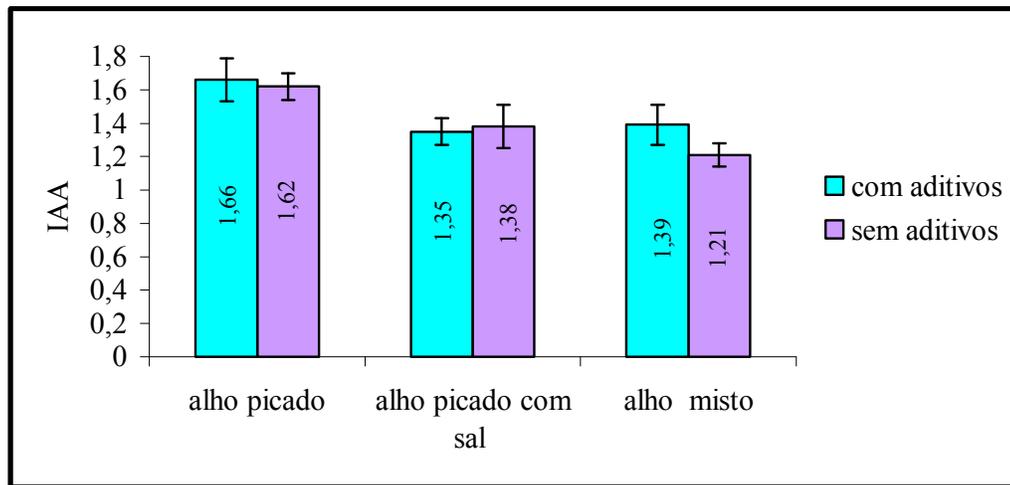


Figura – Índice de atividade antioxidante (IAA), medido pelo aparelho Rancimat®, dos produtos de alho com e sem aditivos.