

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

**Efeito do processamento do alho (*Allium sativum* L.)
sobre os seus compostos bioativos e potencial
antioxidante *in vitro* e *in vivo***

Yara Severino de Queiroz

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Nutrição em Saúde
Pública para obtenção do título de
Doutora em Ciências

Área de concentração: Nutrição em Saúde
Pública.

Orientadora: Profa. Assoc. Elizabeth
Aparecida Ferraz da Silva Torres

**São Paulo
2010**

**Efeito do processamento do alho (*Allium sativum* L.)
sobre os seus compostos bioativos e potencial
antioxidante *in vitro* e *in vivo***

Yara Severino de Queiroz

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Nutrição em Saúde Pública
para obtenção do título de Doutora em
Ciências

Área de concentração: Nutrição em Saúde
Pública.

Orientadora: Profa. Assoc. Elizabeth
Aparecida Ferraz da Silva Torres

**São Paulo
2010**

E expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida **exclusivamente** para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da tese/dissertação.

Ao Neilson por todo o incentivo, amor,
companheirismo e paciência. Sempre estive
ao meu lado me fazendo
acreditar que tudo daria certo.
À Giovanna, minha fortaleza.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a DEUS por 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. A sua participação em todas as etapas foi muito importante.

À Giovanna, minha fortaleza, meu porto seguro. O seu sorriso foi essencial para a finalização desta tese.

À minha irmã Ana Cristina por todo apoio durante este período. Você sabe que não foi fácil, mas estou vencendo todos os obstáculos.

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

À Profa. Dra. Elizabeth A. F. S. Torres pela oportunidade de realizar o doutorado e por toda a orientação concedida. Sempre disposta em me ajudar.

À Profa. Dra. Deborah H. Markowicz Bastos, sempre com disposição a transmitir seus conhecimentos que enriqueceram este trabalho.

Aos Profs. Drs. Marcelo Macedo Rogero, Jaime Amaya Farfan, Maria Beatriz de Abreu Glória e João Enersto de Carvalho, por suas competentes sugestões que melhoram o conteúdo deste trabalho.

À Patrícia Antunes e Marcela Monteiro pelo suporte e ajuda em toda a fase analítica. Vocês tiveram uma participação muito importante neste trabalho. Obrigada pela amizade.

Às amigas, Geni Sampaio, Rosana Soares, Emília Ishimoto e Thaíse Mendes pela importante colaboração e correções.

Ao Silvio J. V. Vicente pela colaboração nas análises e na escrita do artigo. Obrigada por todas as vindas ao Guarujá.

À Tatiana Saldanha, Fellipe Bronze e Fernanda Akaishi pela contribuição nas análises de fitosteróis e pela amizade.

À amiga Juliana Shibao pelo auxílio na análise de PRM.

Ao Demetrius P. Arçari pela colaboração na eutanásia dos animais e no ensaio cometa.

Ao Luís e Renato do Biotério do IMT, pelo espaço cedido e por todo o auxílio durante a fase *in vivo*.

À Luisa do Biotério Central da FMUSP por toda ajuda durante a eutanásia dos animais.

Aos queridos amigos Liania Luzia, Marina Souza, Erica Lemos, Carolina Martins, Malu, Vanessa Capriles, Mariana Canela e Ana Paula Santos pelo incentivo e colaboração.

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

Enfim, agradeço a todos que estiveram ao meu lado.

RESUMO

Queiroz YS. Efeito do processamento do alho (*Allium sativum* L.) sobre os seus compostos bioativos e potencial antioxidante *in vitro* e *in vivo*. São Paulo: 2010. [Tese de Doutorado em Ciências - Faculdade de Saúde Pública da USP].

Introdução: O aumento do consumo de frutas e hortaliças está associado à redução do risco de ocorrência de doenças crônicas não transmissíveis. Este efeito protetor tem sido atribuído particularmente à presença de vários compostos bioativos como compostos fenólicos e organosulfurados, além de fitosteróis presentes no alho que podem contribuir com os efeitos antioxidante e hipolipemiante. Porém, o processamento do alho pode acarretar mudanças na quantidade e na efetividade dos compostos bioativos. Este trabalho teve como objetivo avaliar se a cocção e a fritura do alho reduziram as concentrações de compostos bioativos, o potencial antioxidante *in vitro* e *in vivo* em hamsters hipercolesterolemizados. **Métodos:** *In vitro* - foram determinados nos alhos cru, frito e cozido: a) composição centesimal (proteínas, lipídios, cinzas, carboidratos, fibra alimentar solúvel e insolúvel); b) perfil de ácidos graxos; c) teor de fenólicos totais; d) teor de quercetina, miricetina e apigenina; e) fitosteróis; f) alicina; g) teor de cobre, zinco e selênio; h) produtos intermediários da reação de Maillard; i) potencial antioxidante utilizando os testes ORAC (“Oxygen radical absorbance capacity”), Rancimat[®] e o sistema β -caroteno/ácido linoléico. *In vivo* - hamsters machos foram distribuídos em 5 grupos com 10 animais em cada grupo. 1 - controle; 2 - hipercolesterolêmico; 3- hipercolesterolêmico e alho cru; grupo 4 - hipercolesterolêmico e alho cozido; grupo 5 - hipercolesterolêmico e alho frito. Os animais foram eutanasiados após 4 semanas de estudo para análises do plasma e do tecido hepático. No plasma foi determinado o potencial antioxidante pelo teste ORAC, o perfil lipídico (colesterol total e frações e triacilgliceróis) e verificado a atividade das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT). No tecido hepático foram avaliadas a atividade das enzimas hepáticas (glutaciona peroxidase, catalase e superóxido dismutase) e o potencial antioxidante utilizando dois métodos, ORAC e ensaio cometa. **Resultados:** *In vitro* - O teor de fibras totais para o alho cru foi de 10,0% (71,6% é solúvel e 28,4% é insolúvel). O alto conteúdo de ácidos graxos *trans* no alho frito (14,9%) é devido ao processo de fritura com 50% de gordura vegetal hidrogenada. A cocção não alterou o teor dos minerais analisados. O teor de compostos fenólicos nas amostras de alho variou de 4,2 a 187,7 mg EAG/100g (base seca), dependendo do solvente (água, água/metanol, etanol ou acetona) e do método de extração utilizados. A fritura diminuiu os teores de quercetina e alicina em torno de 24% e 87%, respectivamente. Os fitosteróis β -sitosterol e campesterol estão presentes em todas as amostras, sendo que o alho frito apresentou os maiores teores destes compostos em relação aos alhos cru e cozido, além de apresentar stigmasterol. A fritura foi o processamento térmico

que contribuiu com os maiores valores de produtos intermediários da reação de Maillard. O potencial antioxidante pelo teste ORAC (extratos etanólicos, metanol/água e acetona) reduziu com o processamento do alho, sendo que a redução foi maior para a fritura. A inibição da oxidação lipídica foi melhor nos extratos metanol/água. ***In vivo*** - O grupo de animais que recebeu ração hiperlipemiante e alho cru teve menor ganho de peso em relação aos grupos que receberam alho frito ou cozido. Os alhos cru e cozido foram eficazes na redução de lipídios no plasma dos hamsters. O potencial antioxidante, avaliado pelos testes ORAC e ensaio cometa, dos grupos hipercolesterolemizados suplementados com alho cru ou cozido apresentaram valores superiores em relação ao grupo hipercolesterolemizado não suplementado. Houve aumento da atividade das enzimas antioxidantes catalase, glutathione peroxidase e superóxido dismutase para todos os grupos suplementados com alho. Em todos os grupos estudados não ocorreram danos estruturais ou funcionais no tecido hepático. **Conclusões:** Os resultados corroboram com o esperado e sugerem que os alhos cru e cozido podem ocasionar benefícios à saúde, haja vista que estes produtos possuem compostos bioativos, efeito hipolipemiante e apresentaram alto potencial antioxidante no plasma e no tecido hepático, além do aumento da atividade de enzimas antioxidantes que estão envolvidas em mecanismos de proteção à saúde.

Descritores: Alho; Processamento; Compostos bioativos; Potencial antioxidante; Perfil lipídico; Enzimas antioxidantes.

ABSTRACT

Queiroz YS. Effect of processing of garlic (*Allium sativum* L.) on their bioactive compounds and antioxidant potential *in vitro* and *in vivo*. São Paulo: 2010. [Tese de Doutorado em Ciências - Faculdade de Saúde Pública da USP].

Introduction: The increased consumption of fruits and vegetables is associated with reduced risks of chronic diseases. This protective effect has been attributed particularly to the presence of several bioactive compounds such as phenolic and organosulfur compounds, likewise phytosterols present in garlic that may contribute to the antioxidant and lipid-lowering effects. However, the processing of garlic can cause changes in the quantity and effectiveness of bioactive compounds. This study aimed to evaluate whether the cooking and frying of garlic reduced the bioactive compounds concentrations, the antioxidant potential *in vitro* and *in vivo* in hypercholesterolemic hamsters. **Methods:** *In vitro* - were determined in raw garlic, fried and boiling: a) composition (protein, fat, ash, carbohydrates, dietary fiber, soluble and insoluble), b) fatty acid profile, c) total phenolic content, d) content of quercetin, myricetin and apigenin, e) phytosterols, f) allicin, g) content of copper, zinc and selenium, h) Maillard reaction products, i) antioxidant potential using the ORAC test (Oxygen radical absorbance capacity), Rancimat[®] and system β - caroteno/ácido linoleic. *In vivo* - male hamsters were divided into five groups with 10 animals each. 1 - control, 2 - hypercholesterolemic, 3 - hypercholesterolemic and raw garlic, 4 - hypercholesterolemic and boiling garlic, group 5 - hypercholesterolemic and fried garlic. Samples of blood and liver were collected after a 4-week experimental period. In plasma were determined the antioxidant potential by the ORAC assay, the lipid profile (total cholesterol and fractions and triacylglycerols) and verified the activity of enzymes aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT). In liver tissue were evaluated the activity of liver enzymes (glutathione peroxidase, catalase and superoxide dismutase) and the antioxidant potential using two methods, ORAC and comet assay. **Results:** *In vitro* - The content of dietary fiber for raw garlic was 10.0% (71.6% is soluble and 28.4% is insoluble). The high content of *trans* fatty acids in fried garlic (14.9%) is due to the frying process with 50% hydrogenated vegetable fat. The cooking did not alter the content of the minerals analyzed. The content of phenolic compounds in garlic samples ranged from 4.2 to 187.7 mg EAG/100g (dry matter), depending on the solvent (water, water / methanol, ethanol or acetone) and the extraction method used. Frying decreased the content of quercetin and allicin around 24% and 87% respectively. The phytosterols β -sitosterol and campesterol are present in all samples, and the fried garlic showed the highest levels of these compounds in relation to raw and boiling garlic, besides presenting stigmasterol. Frying was the heat processing that contributed to the higher values of products of the Maillard reaction. The antioxidant potential by the ORAC assay (ethanol extracts, methanol/water and

acetone) was reduced with the processing of garlic, and the reduction was greater for frying. The inhibition of lipid oxidation was better in methanol/water extracts. ***In vivo*** - The group of animals that received ration hyperlipidemic and raw garlic had less weight gain compared with groups that received garlic fried or boiling. Raw and boiling garlic were effective in reducing lipids in hamsters' plasma. The antioxidant potential (measured by the ORAC and comet assay tests) of the groups hypercholesterolemic supplemented with raw or boiling garlic had higher values than the not supplemented group hypercholesterolemic. There was increased activity of antioxidant enzymes catalase, glutathione peroxidase and superoxide dismutase in all groups supplemented with garlic. In all groups there was no structural or functional damage in liver tissue. **Conclusions:** These results corroborate the expected and suggest that the raw and boiling garlic may lead to health benefits, given that these products have bioactive compounds, hypolipidemic effect and showed a high antioxidant potential in plasma and liver tissue, in addition to increased activity of antioxidant enzymes that are involved in mechanisms of health protection.

Keywords: Garlic, Processing, Bioactive compounds, Antioxidant potential, Fatty acid profile, Antioxidant enzymes.

ÍNDICE

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	9
ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS UTILIZADOS	15
LISTA DE TABELAS	19
LISTA DE FIGURAS	21
LISTA DE QUADROS	23
APRESENTAÇÃO	24
CAPÍTULO 1.....	25
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
1 ESTRESSE OXIDATIVO E SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE	26
2 ALHO.....	28
2.1 Compostos bioativos	32
2.1.1 Compostos fenólicos	32
2.1.2 Compostos organosulfurados.....	35
2.1.2.1 Compostos organosulfurados em alho fresco intacto.....	35
2.1.2.2 Compostos organosulfurados em alho fresco picado	38
2.1.3 Fitosteróis	39
2.2 Propriedades bioativas do alho.....	41
2.2.1 Potencial antioxidante.....	41
2.2.2 Outras propriedades	43
2.3 Influência do processamento dos alimentos no teor de compostos bioativos, no potencial antioxidante e na formação de novos produtos.....	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
CAPÍTULO 2.....	59
ALHO CRU, COZIDO E FRITO: CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL, COMPOSTOS BIOATIVOS E POTENCIAL ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i>	59
1 INTRODUÇÃO.....	60
2 ASPECTOS ÉTICOS.....	61
3 ASPECTO AMBIENTAL.....	61
4 OBJETIVOS.....	62
4.1 Geral	62
4.2 Específicos	62
5 MATERIAIS E MÉTODOS	62

5.1	Reagentes e equipamentos	62
5.2	Amostras	63
5.2.1	Peso médio dos dentes de alho	63
5.2.2	Processamento das amostras.....	64
5.3	Protocolo experimental <i>in vitro</i>	67
5.3.1	Composição proximal	68
5.3.2	Perfil de ácidos graxos	69
5.3.3	Selênio, zinco e cobre.....	70
5.3.4	Obtenção dos extratos	71
5.3.5	Determinação dos sólidos solúveis dos extratos.....	76
5.3.6	Compostos bioativos	76
5.3.6.1	Determinação do compostos fenólicos totais.....	76
5.3.6.2	Quercetina, miricetina e apigenina por HPLC	77
5.3.6.3	Alicina	78
5.3.6.4	Fitosteróis.....	79
5.3.7	Análise de compostos intermediários fluorescentes da reação de Maillard	80
5.3.8	Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	81
5.3.8.1	Teste ORAC (“Oxygen radical absorbance capacity”)	81
5.3.8.2	Sistema β -caroteno/ácido linoléico	82
5.3.8.3	Avaliação da capacidade protetora da oxidação lipídica utilizando o aparelho Rancimat [®]	83
5.3.9	Análise dos Dados.....	83
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	84
6.1	Composição centesimal	84
6.2	Perfil de ácidos graxos.....	85
6.3	Minerais	86
6.4	Compostos bioativos	87
6.4.1	Sólidos solúveis e fenólicos totais	87
6.4.2	Quercetina, miricetina e apigenina por HPLC.....	91
6.4.3	Alicina	92
6.4.4	Fitosteróis	93
6.5	Compostos intermediários fluorescentes da reação de Maillard.....	94
6.6	Potencial antioxidante.....	95
7	CONCLUSÕES	103
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	105
	 CAPÍTULO 3.....	112
	PROCESSAMENTO DO ALHO: INFLUÊNCIA SOBRE O POTENCIAL ANTIOXIDANTE EM HAMSTERS HIPERCOLESTEROLEMIZADOS	112
	1 INTRODUÇÃO.....	113

2 ASPECTOS ÉTICOS.....	115
3 HIPÓTESE	115
4 OBJETIVOS.....	115
4.1 Geral	115
4.2 Específicos	115
5 MATERIAIS E MÉTODOS	116
5.1 Reagentes e equipamentos.....	116
5.2 Protocolo experimental <i>in vivo</i>	116
5.3 Animais.....	118
5.3.1 Experimento.....	119
5.4 Rações.....	119
5.4.1 Composição da ração	119
5.4.2 Preparação das rações.....	121
5.4.3 Perfil lipídico das rações	122
5.5 Coleta do material biológico.....	122
5.6 Determinação do perfil lipídico no plasma.....	123
5.7 Preparo do homogenato do tecido hepático.....	124
5.8 Quantificação de proteínas totais	124
5.9 Avaliação da atividade das enzimas antioxidantes hepáticas	125
5.9.1 Superóxido dismutase (SOD)	125
5.9.2 Glutathiona peroxidase (GPx)	126
5.9.3 Catalase (Cat).....	126
5.10 Potencial antioxidante.....	127
5.10.1 Teste ORAC (“Oxygen radical absorbance capacity”)	127
5.10.2 Ensaio Cometa	128
5.11 Atividade das enzimas hepáticas aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase	129
5.11.1 Aspartato aminotransferase (AST) ou transaminase oxalacética (TGO)	129
5.11.2 Alanina aminotransferase (ALT) ou transaminase pirúvica (TGP) ..	130
5.12 Análise dos dados.....	130
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	131
6.1 Ensaio Biológico	131
6.1.1 Perfil lipídico das rações	131
6.1.2 Peso dos animais, consumo de ração e água	132
6.1.3 Perfil lipídico plasmático.....	133
6.1.4 Determinação da atividade antioxidante das enzimas hepáticas	136
6.1.5 Potencial antioxidante	137
6.1.5.1 Teste ORAC (“Oxygen radical absorbance capacity”)	137
6.1.5.2. Ensaio Cometa	138

6.1.6 Atividade das enzimas hepáticas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT).....	139
7 CONCLUSÕES	141
8 CONCLUSÃO FINAL	142
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	143
ANEXO 1- Aspecto Ético / Faculdade de Saúde Pública	149
ANEXO 2 - Aspectos Ambientais	150
ANEXO 3 – Reagentes e equipamentos.....	151
ANEXO 4 - Cromatograma do perfil de ácidos graxos do padrão e das amostras de alho liofilizadas	155
ANEXO 5 - Cromatograma do padrão de fitosteróis e das amostras de alho liofilizadas.....	156
ANEXO 6 - Aspecto Ético / IMT – Faculdade de Medicina Tropical/USP.....	157
ANEXO 7 - Protocolo – Comissão de Ensino e Pesquisa - HC/FMUSP.....	158
ANEXO 8 - Cromatograma do perfil de ácidos graxos das rações.....	159
CURRÍCULO LATTES – Yara Severino de Queiroz	160
CURRÍCULO LATTES – Elizabeth A. F. S. Torres	161

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS UTILIZADOS

AAPH	2,2'-azobis(2-amidinopropano)3'6'-diidroxí-espiro[isobenzofurano-1[3H],9'[9H]-xanten-3-ona
ABTS ⁺	Radical 2,2'-azinobis
a.C	Antes de Cristo
AD	Doença de Alzheimer
AGE	Extrato de alho envelhecido
AGEs	<i>Advanced Glycation Endproducts</i>
ALT	Alanina aminotransferase
AP	Ácido pirúvico
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
BF ₃	Trifluoreto de boro-metanol
C	Grupo controle
Cat	Catalase
CEA	Coefficiente de eficiência alimentar
CEAGESP	Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo
cm	Centímetro
CO ₂	Gás carbônico
CT	Colesterol total
Cu	Cobre
Cu-SOD	Cobre-superóxido dismutase
°C	Graus Celsius
DAS	Dialil sulfito
DADS	Dialil dissulfito
DATS	Dialil trissulfito
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucléico
Δ	Delta
ΔT	Varição de temperatura

DNPH	2,4-dinitrofenilidrazina
DPPH	1,1-difenil-2-picrilidrazil
e ⁻	Elétron
EAG	Equivalente de ácido gálico
EC-SOD	Superóxido dismutase extracelular
ERN	Espécies reativas do nitrogênio
ERO	Espécies reativas do oxigênio
F	Alho frito
Fe ⁺²	Íon ferroso
Fe ⁺³	Íon férrico
FAI	Fibra alimentar insolúvel
FAS	Fibra alimentar solúvel
FRAP	Ensaio do poder antioxidante em redução ferríca
FS	Fitosteróis
γ	Gama
g	Gramma
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
H	Grupo hipercolesterolêmico
H ⁺	Íon hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
HDL-c	Lipoproteína de alta densidade-colesterol
HNO ₃	Ácido nítrico
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
IAA	Índice de atividade antioxidante
IF	Intensidade de fluorescência
INT	2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-cloreto de feniltetrazol
IOL	Inibição da oxidação lipídica

kcal	Quilocalorias
kg	Quilo
kPa	kilo Pascal
L	Litro
L [·]	Radical livre lipídico
LDL-c	Lipoproteína de baixa densidade-colesterol
LO [·]	Radical alcóxila
LOO [·]	Radical peróxila
μmol	Micromol
μm	Micrômetro
μg	Micrograma
μL	Microlitro
m	Metro
mg	Miligrama
mm	Milímetro
mM	Milimolar
Mn-SOD	Manganês-superóxido dismutase
M	Molar
N	Normalidade
N ₂	Nitrogênio
NAC	N-acetil cisteína
NaCl	Cloreto de sódio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo hidreto
nm	Nanômetro
NO [·]	Radical óxido nítrico
NaOH	Hidróxido de sódio
%	Porcentagem
p	Nível de significância
O ₂	Oxigênio molecular
O ⁻²	Radical superóxido
¹ O ₂	Oxigênio singlete
OH [·]	Radical hidroxila

ONOO ⁻	Peroxinitrito
ORAC	“Oxygen radical absorbance capacity”
P.A.	Padrão analítico
pH	Potencial hidrogeniônico
PML	Peroxidação da membrana lipídica
PRM	Produtos da reação de Maillard
p/v	Peso/volume
R	Alho cru
RL	Radical livre
ROOH	Hidroperóxido
rpm	Rotação por minuto
R\$	Reais
SAC	S-alilcisteína
SEC	S-acetil cisteína
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico
TBHQ	Tert-butilidroquinona
TG	Triacilgliceróis
TGO	Aspartato aminotransferase
TGP	Alanina aminotransferase
Trolox	6'-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
U/L	Unidades/litro
UV	Ultra violeta
VLDL-c	Lipoproteína de muita baixa densidade-colesterol
v/v	Volume/volume
XOD	Xantina oxidase
Z	Alho cozido
Zn	Zinco

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição centesimal do Alho.....	29
Tabela 2 - Número e peso médio (g) dos dentes de alho de 6 bulbos.....	61
Tabela 3 - Correlação linear dos fenólicos quercetina, miricetna e apigenina.....	75
Tabela 4 - Limites de detecção e quantificação do método e recuperação dos fenólicos quercetina, miricetina e apiginina.....	75
Tabela 5 - Composição proximal (média \pm desvio padrão) em base seca dos alhos cru, cozido e frito liofilizados.....	82
Tabela 6 - Média \pm desvio padrão do perfil de ácidos graxos (g/100 g do total de ácidos graxos) dos alhos cru, cozido e frito liofilizados.....	83
Tabela 7 - Minerais (média \pm desvio padrão) em base seca dos alhos cru, cozido e frito liofilizados.....	84
Tabela 8 - Sólidos solúveis e teor de fenólicos totais (média \pm desvio padrão), em base seca, dos extratos de alho cru liofilizado.....	87
Tabela 9 - Sólidos solúveis e teor de fenólicos totais (média \pm desvio padrão), em base seca, dos extratos de alho cozido liofilizado.....	87
Tabela 10 - Sólidos solúveis e teor de fenólicos totais (média \pm desvio padrão), em base seca, dos extratos de alho frito liofilizado.....	88
Tabela 11 - Concentração (média \pm desvio padrão) de quercetina, miricetina e apigenina em alho cru, cozido e frito.....	89
Tabela 12 - Conteúdo de alicina (média \pm desvio padrão) em amostras de alho liofilizadas.....	90
Tabela 13 - Concentração de fitosteróis (média \pm desvio padrão) em amostras de alho liofilizadas, em base seca.....	91
Tabela 14 - Produtos intermediários da reação de Maillard (média \pm desvio padrão) em amostras de alho liofilizadas.....	92
Tabela 15 - Potencial antioxidante (média \pm desvio padrão) dos extratos de alho cru liofilizado segundo o método e solvente de extração.....	95
Tabela 16 - Potencial antioxidante (média \pm desvio padrão) dos extratos de alho cozido liofilizado, segundo o método e solvente de extração.....	96

Tabela 17 - Potencial antioxidante (média \pm desvio padrão) dos extratos de alho frito liofilizado, segundo o método e solvente de extração.....	97
Tabela 18 - Composição da ração comercial Nuvilab [®] CR1 fornecida no período de aclimação.....	117
Tabela 19 - Composição das rações utilizadas no ensaio biológico após o período de aclimação.....	118
Tabela 20 - Perfil de ácidos graxos das rações controle e hiperlipemiante.....	129
Tabela 21 - Peso inicial e final, ganho de peso, consumo de ração e água e coeficiente alimentar (média \pm desvio-padrão) dos hamsters.....	130
Tabela 22 - Média \pm desvio-padrão de colesterol total (CT), HDL-c, não HDL-c e triacilgliceróis (TG) nos grupos experimentais.....	133
Tabela 23 - Atividade das enzimas antioxidantes. Valores em média \pm desvio padrão.....	134
Tabela 24 - Potencial antioxidante total por ORAC no plasma e no fígado de hamsters.....	135
Tabela 25 - Efeito da intervenção com alho nos níveis de danos oxidativos ao DNA avaliada pelo Ensaio cometa.....	136

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Alho.....	26
Figura 2 - Produção de alho no Brasil.....	27
Figura 3 - Evolução do consumo de alho per capita.....	28
Figura 4 - Visão simplificada das principais vias de biossíntese de compostos secundários e suas inter-relações com o metabolismo primário.....	30
Figura 5 - Estrutura química da quercetina, apigenina e miricetina.....	31
Figura 6 - Reações químicas dos principais compostos organosulfurados encontrados no alho.....	34
Figura 7 - Formação do composto organosulfurado alicina.....	36
Figura 8 - Esqueleto principal dos esteróis.....	37
Figura 9 - Semelhanças estruturais entre o colesterol e os fitosteróis.....	37
Figura 10 - Esquema do processamento das amostras.....	63
Figura 11 - Esquema do protocolo experimental <i>in vitro</i>	64
Figura 12 - Esquema da extração das diferentes amostras de alho, segundo NUUTILA <i>et al.</i> (2003), com modificações.....	70
Figura 13 - Esquema da extração das diferentes amostras de alho, segundo GORISNTEIN <i>et al.</i> (2006b), com modificações.....	71
Figura 14 - Esquema da extração de compostos lipofílicos das diferentes amostras de alho, segundo GORISNTEIN <i>et al.</i> (2006b).....	72
Figura 15 - Teor de fenólicos totais (mg EAG/100g), em base seca, dos diferentes processamentos do alho.....	86
Figura 16 - Inibição da oxidação lipídica (IOL), pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico, dos diferentes processamentos do alho.....	98
Figura 17 - Índice de atividade antioxidante (IAA), utilizando o aparelho Rancimat, dos diferentes processamentos do alho.....	99
Figura 18 - Potencial antioxidante, pelo método ORAC ($\mu\text{mol Trolox/mL}$), dos diferentes processamentos do alho.....	99
Figura 19 - Esquema do protocolo experimental <i>in vivo</i>	114
Figura 20 - Alojamento dos hamsters no biotério, em gaiolas individuais.....	115
Figura 21 - Ração.....	119
Figura 22 - Anestesia.....	120

Figura 23 - Perfusão com solução salina.....	120
Figura 24 - Atividade das enzimas AST e ALT	137

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação do alho por tamanho e cor.....	28
Quadro 2 - Propriedades bioativas do alho.....	41

APRESENTAÇÃO

O presente trabalho foi dividido em 3 capítulos:

Capítulo 1 - Revisão bibliográfica sobre o alho, reunindo os trabalhos mais relevantes sobre o seu processamento, compostos bioativos, seu potencial antioxidante e outros benefícios à saúde humana, além de abordar sobre estresse oxidativo e defesa antioxidante do organismo.

Capítulo 2 - Caracterização nutricional, compostos bioativos e potencial antioxidante *in vitro* do alho cru, cozido e frito.

Capítulo 3 - Influência do processamento do alho sobre o potencial antioxidante em hamsters hipercolesterolemizados.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 ESTRESSE OXIDATIVO E SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE

Em sistemas biológicos, membranas celulares de organelas (mitocôndrias, peroxissomas) são os principais alvos das espécies reativas do oxigênio (ERO) via oxidação lipídica, uma vez que estas organelas contêm grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados. Estes processos oxidativos resultam em alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas, e os produtos tóxicos gerados resultam na morte celular (NAWAR 1996; FERREIRA e MATSUBARA 1997; NIKI 2010). As lesões causadas pelo processo oxidativo *in vivo* induzidas por ERO e por espécies reativas do nitrogênio (ERN) podem estar associadas a várias condições clínicas, como lesões das fibras cardíacas, iniciação e progressão da carcinogênese, inflamações crônicas, diabetes, doenças auto-imunes, catarata e relacionadas ao próprio processo de envelhecimento (ABDALLA 2000; CHENG *et al.* 2001; POLIDORI *et al.* 2001; CAMOUGRANG e RIGOULET 2001; VALKO *et al.* 2006).

As ERO e as ERN livres podem ser gerados durante as funções metabólicas normais, porém as células, por meio de sistemas naturais de defesa constituídos principalmente pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx), catalase (Cat) são protegidas (NIKI 2010). 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; LAGUERRE *et al.* 2007). Por outro lado, os radicais livres também exercem efeitos benéficos quando envolvidos na fagocitose, na regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e na síntese de substâncias biológicas importantes (HALLIWELL 2007). Ou seja, a formação de ERO, em níveis fisiológicos, não é necessariamente lesiva; estas espécies, quando produzidas de forma controlada, atuam na regulação da sinalização celular e da expressão gênica (BARZILAI e YAMAMOTO 2004).

O desenvolvimento de sistemas naturais de defesa antioxidante pelo organismo está relacionado ao processo evolutivo da vida anaeróbica para a aeróbica. Os primeiros organismos vivos do planeta eram essencialmente

anaeróbios; sua evolução para a forma de vida aeróbica envolveu a adaptação a maiores níveis de oxigênio (GUTTERIDGE 1995). Para se proteger dos efeitos deletérios das ERO e das ERN, os organismos aeróbios desenvolveram sistemas defensivos com a função de regular a geração destas espécies ou neutralizá-las após sua produção (PINCEMAIL 2003; NIKI 2010). Os sistemas de defesa do organismo são constituídos por enzimas antioxidantes (SOD, Cat, GPx), antioxidantes hidrossolúveis (ascorbato, glutathiona reduzida e urato) e antioxidantes lipossolúveis (α -tocoferóis e carotenóides), que são importantes para reduzir as concentrações das ERO, as quais são produzidas no metabolismo celular, e inibir a modificação oxidativa das lipoproteínas (STOCKER e KEANEY-JR 2004).

A função da SOD é catalisar a reação de dismutação do ânion radical superóxido, gerando oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio. Esta é a principal isoenzima nos fluídos extracelulares, mas também ocorre em tecidos (MARKLUND 1984; NIKI 2004). Existem três formas de SOD em mamíferos: a cobre-zinco (Cu,Zn-SOD), manganês (Mn-SOD), e a SOD extracelular (EC-SOD). A Cu,Zn-SOD está presente no citosol de todas as células enquanto a Mn-SOD está localizada principalmente nas mitocôndrias. Como indicado pelo nome, a EC-SOD é uma forma extracelular da enzima e encontra-se em equilíbrio entre o plasma e a superfície das células endoteliais, onde exerce sua ação protetora antioxidante (STOCKER e KEANEY-JR 2004).

A Cat decompõe diretamente o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular, o qual resulta da dismutação do ânion radical superóxido (STOCKER e KEANEY-JR 2004). Esta enzima é encontrada no sangue, medula óssea, mucosas, rim e fígado (FERREIRA e MATSUBARA 1997).

A GPx coopera com a Cat na remoção de hidroperóxidos (ROOH) por utilizar a glutathiona reduzida (GSH) para reduzir hidroperóxidos, formando água e glutathiona oxidada (GSSG). Esta enzima é específica quanto ao doador de hidrogênio (GSH), mas pode reduzir vários hidroperóxidos orgânicos, inclusive hidroperóxidos lipídicos (TAN *et al.* 1986; NIKI 2004). A glutathiona peroxidase opera em conjunto com a glutathiona redutase que catalisa a redução da glutathiona oxidada pelo NADPH. Além do seu papel central na atividade da glutathiona peroxidase, a glutathiona está envolvida em várias outras vias antioxidantes,

incluindo atividade “scavenger” direta sobre oxidantes, no metabolismo do ascorbato e na detoxificação de xenobióticos via glutathione transferase. Algumas vezes, a glutathione transferase também apresenta atividade semelhante à peroxidase (STOCKER e KEANEY-Jr 2004).

A SOD, a Cat e a GPx são três enzimas primárias envolvidas na eliminação direta das ERO como o radical hidroxila, o íon monovalente superóxido e o peróxido de hidrogênio. Estas enzimas atuam por mecanismos sinérgicos de modo a garantir a proteção celular (MICHIELS *et al.* 1994).

Estudos têm demonstrado associações positivas entre o consumo de várias substâncias presentes nos alimentos, como os compostos fenólicos, e o aumento da expressão gênica de enzimas antioxidantes hepáticas, resultando na melhora da capacidade antioxidante, que é condição atuante na inativação das ERO e das ERN (KWAK *et al.* 2004; YEH e YEN 2006; MARTINELLO *et al.* 2006; ISHIMOTO 2008; MATSUMOTO *et al.* 2009; VICENTE 2009).

Dentre os alimentos que apresentam em sua composição substâncias bioativas, incluindo elementos com potencial antioxidante, destaca-se o alho.

2 ALHO

O alho (*Allium sativum*) (Figura 1) pertence à família Liliaceae, que contém mais de 700 espécies, incluindo cebola, alho-poró e cebolinha (BARRERA e CAMARGO 1985). Foi descoberto no Egito, por volta de 3.700 a.C., onde era usado como medicamento (FENWICK e HANLEY 1985; BLOCK 1985).

Figura 1 – Alho.

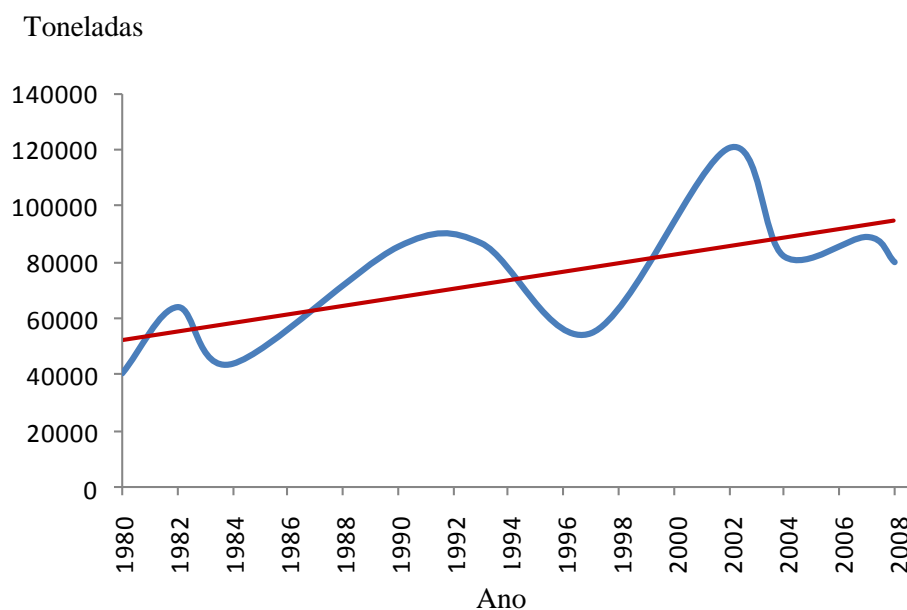


Nas décadas de 60 e 70 a produção brasileira de alho era localizada principalmente nos estados de Minas Gerais e Goiás, onde se cultivavam alhos comuns, brancos, de baixo valor comercial. O crescimento da produção de alhos nobres e roxos no Brasil foi incrementado na década de 80. Com o aumento da produção foi possível abastecer 90% do consumo nacional na safra 1988/89 (ANAPA 2009).

O Brasil cultivou alho na faixa dos 18 mil hectares, no final dos anos 80 e no início da década de 90, reduzindo muito a produção no final dessa mesma década. As áreas de plantio voltaram a crescer no início dos anos dois mil e recuaram novamente em 2004, estabilizando-se até 2008 quando novamente houve uma redução na área. A área de plantio de alho no Brasil em 2008 é a menor dos últimos 20 anos (Figura 2). Hoje a participação do alho nacional no abastecimento está ao redor dos 30%, com uma área total de plantio de 9,6 mil sendo 8 mil hectares com alho nobre roxo (ANAPA 2009).

A oferta atual de alho no país é de 65% de semente chinesa e 35% de alho nobre roxo produzido no Brasil e na Argentina (ANAPA 2009).

Figura 2 - Produção de alho no Brasil.

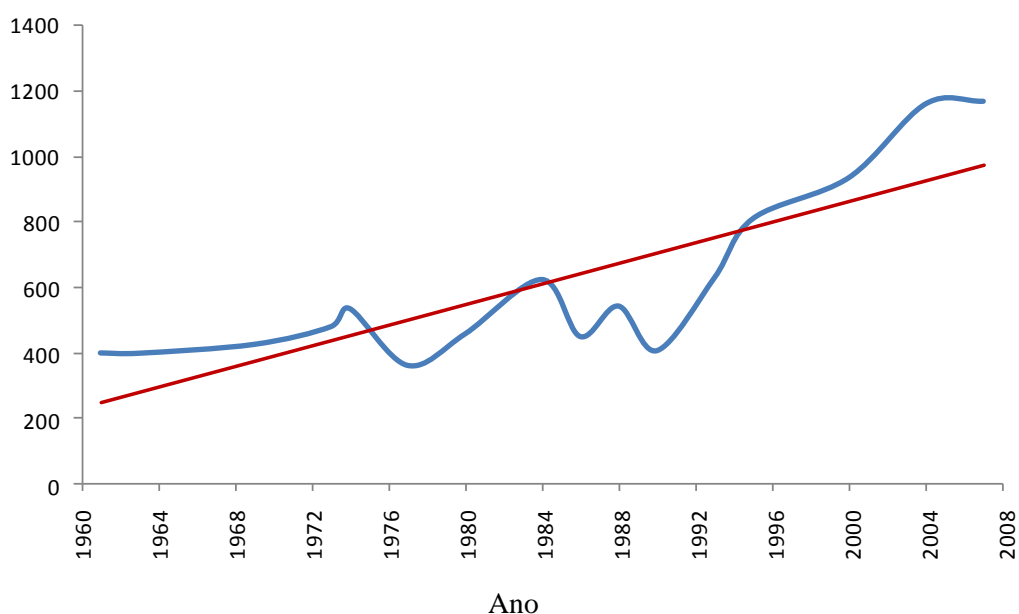


A importância econômica da cultura do alho tem aumentado sensivelmente nos últimos anos, não só pelo seu uso generalizado como especiaria, mas também por algumas qualidades terapêuticas que lhe são atribuídas. No Brasil, o alho tem grande importância econômica e social, já que é uma hortaliça cultivada, na grande maioria, por pequenos produtores, com utilização intensa de mão-de-obra. O valor total da produção é estimado em mais de R\$ 234 milhões por ano (EMBRAPA 2004).

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). O consumo per capita aumentou significativamente, passando de 0,49 kg/habitante/ano no ano de 1961 para mais de um quilo em 2007. Nos últimos anos esse aumento foi ao redor de 4% ao ano, conforme pode ser visto na Figura 3 (ANAPA 2009).

Figura 3 - Evolução do consumo de alho per capita.

Consumo per capita (g/habitante/ano)



A classificação do alho para consumo baseia-se na Comissão Técnica de Normas e Padrões do Ministério da Agricultura (Quadro 1).

Quadro 1 - Classificação do alho por tamanho e cor.

Grupo	Nobre	Até 20 dentes por cabeça
	Comum	Mais de 20 dentes por cabeça
Subgrupo	1	Casca branca - Película branca
	2	Casca roxa - Película branca
	3	Casca roxa - Película roxa
Classe	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.

Os alhos importados da Argentina, China e Espanha são do grupo nobre, subgrupo 3, assim como o da região de Curitibanos – SC/Brasil (ANAPA 2009).

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, com destaque para os organosulfurados, fenólicos e fitosteróis, cuja importância será discutida nos próximos itens.

Tabela 1 - Composição centesimal do alho.

Nutrientes	Unidade	Valor por 100g
Calorias	Kcal	113,00
Umidade	g	67,50
Proteínas	g	7,00
Lipídios	g	0,20
Carboidratos	g	23,90
Fibra alimentar total	g	4,30
Cinzas	g	1,30
Cálcio	mg	14,00
Ferro	mg	0,80
Magnésio	mg	0,24
Fósforo	mg	149,00
Potássio	mg	535,00
Sódio	mg	5,00
Zinco	mg	0,80
Cobre	mg	0,15
Manganês	mg	0,24
Tiamina	mg	0,18
Riboflavina	mg	Tr
Vitamina B6	mg	0,44

Fonte: Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO), segunda edição, 2006 - Campinas.

2.1 Compostos bioativos

2.1.1 Compostos fenólicos

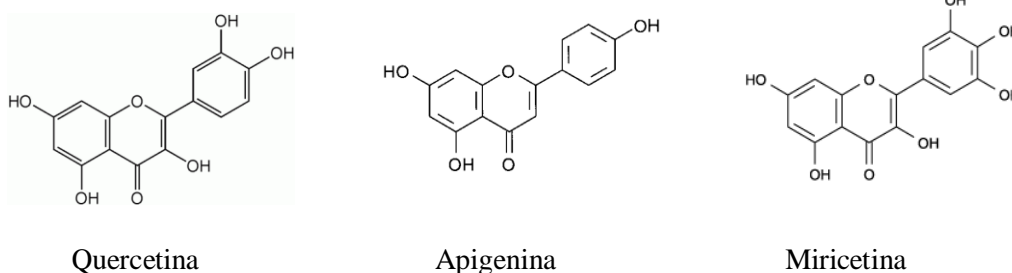
As plantas são fontes alimentares que contêm diversos tipos de compostos químicos, comumente chamados de fitoquímicos (BRAVO 1998; KRIS-ETHERTON *et al.* 2002). Os fenólicos são uma classe de fitoquímicos, e representam um grande grupo de moléculas amplamente distribuídas na natureza (com pelo menos 8.000 moléculas conhecidas); são produtos do metabolismo secundário das plantas (Figura 4), gerados através de duas vias principais: via ácido chiquímico e via ácido malônico (HAGERMAN 1997; CARDOZO *et al.* 2007).

Os fenólicos também podem existir de forma associada a compostos como o ácido carboxílico, ácidos orgânicos, aminas, lipídios e inclusive com outros fenólicos. A glicose é o açúcar mais comumente encontrado ligado aos fenólicos, apesar da galactose, raminose, xilose e a arabinose também estarem presentes em algumas moléculas (BRAVO 1998; HAN *et al.* 2007).

Apresentam capacidade antioxidante por sequestrar radicais hidroxila, superóxido e o oxigênio singlete (DONNELLY e ROBSON 1995; LAGUERRE *et al.* 2007) e por bloquear radicais livres na reação em cadeia ou quelar metais (MOREIRA e MANCINI-FILHO 2004). A inativação de radicais de oxigênio por compostos fenólicos ocorre pela formação de espécies de menor reatividade, ou pela ação como doador de hidrogênio. A menor reatividade ocorre devido ao deslocamento do elétron não pareado para a estrutura do anel aromático (HALLIWELL e GUTTERIDGE 1989; SIMIC e JAVANOVIC 1994).

O alho possui compostos fenólicos, como os flavonóides (Figura 5), quercetina (flavonol), apigenina (flavona) e miricetina (flavonol) (EGEN *et al.* 1992; BOREX 2001; MIEAN e MOHAMED 2001; NUUTILA *et al.* 2003; LANZOTTI 2006).

Figura 5 - Estrutura química da quercetina, apigenina e miricetina.



Os flavonóides são importantes compostos com potencial antioxidante. Em particular, a quercetina tem demonstrado habilidade em proteger a partícula LDL-colesterol contra a oxidação, bem como reduzir os riscos cardiovasculares (LANZOTTI 2006).

2.1.2 Compostos organosulfurados

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; OMAR e Al-WABEL 2010). 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 (HOLUB *et al.* 2002).

2.1.2.1 Compostos organosulfurados em alho fresco intacto

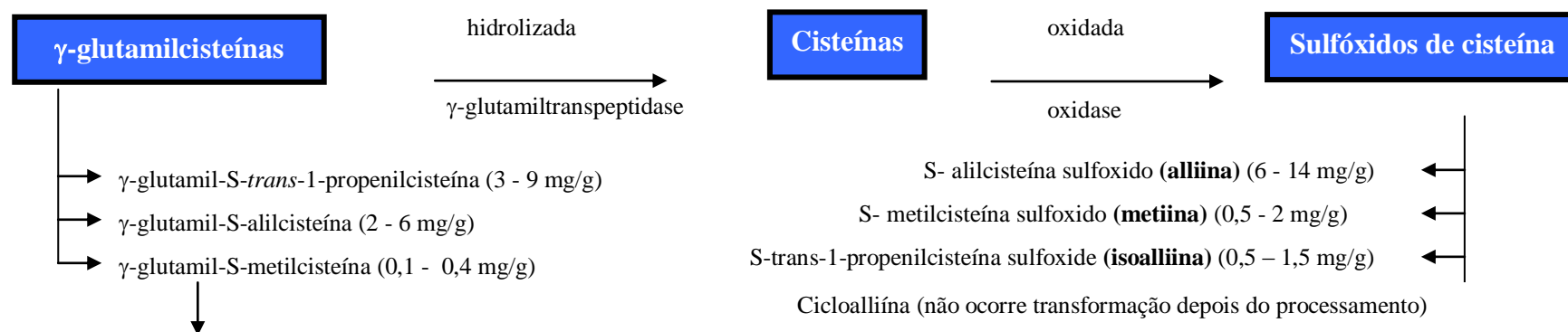
Os compostos organosulfurados dos dentes de alho fresco intactos são os sulfóxidos de cisteína (principalmente alliina, e em menor quantidade a metiina e a isoalliina) e as γ -glutamilcisteínas (principalmente γ -glutamil-S-*trans*-1-propenilcisteína e menor quantidade da γ -glutamil-S-alilcisteína e da γ -glutamil-S-metilcisteína) (HOLUB *et al.* 2002; LANZOTTI 2006). Sulfóxidos 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 (HOLUB *et al.* 2002).

Os compostos γ -glutamilcisteínas servem como reserva para a formação das cisteínas, que posteriormente são convertidos em sulfóxidos de cisteína, conforme apresentado na Figura 6, item a. Durante o plantio, a germinação e o armazenamento, apenas uma parte das γ -glutamilcisteínas são gradualmente hidrolisadas e depois oxidadas para formarem os sulfóxidos de cisteínas pelo aumento dos níveis da enzima γ -glutamyltranspeptidase (há aumento da formação, conforme o decréscimo da temperatura) (HOLUB *et al.* 2002).

As γ -glutamilcisteínas que não foram convertidas a sulfóxidos de cisteína, transformam em S-alilcisteína (SAC) e S-1-propenilcisteína, quando extraídas em água por um longo período (Figura 6, item c). Os sulfóxidos de cisteínas (8 - 19 mg/g de alho fresco) e as γ -glutamilcisteínas (5 - 16 mg/g de alho fresco) somam

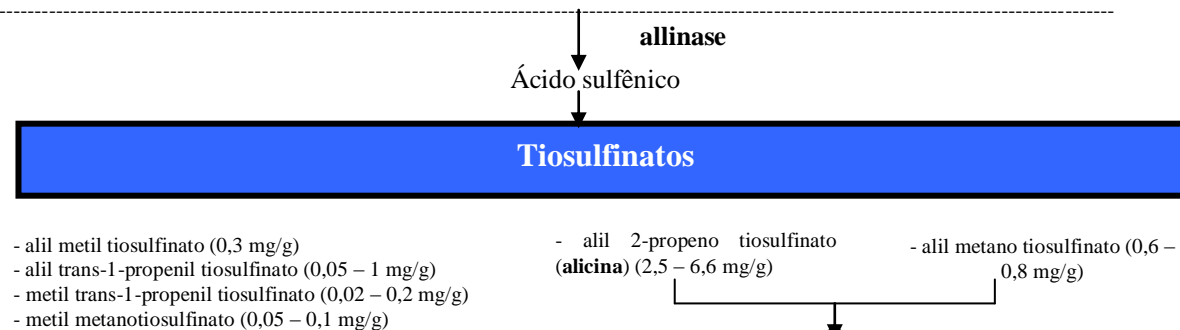
aproximadamente 95% do total de enxofre nos alhos frescos. Aproximadamente 85% dos sulfóxidos de cisteína são encontrados no bulbo, 12% nas folhas e 2% nas raízes, enquanto as γ -glutamilcisteínas são apenas encontradas nos bulbos (HOLUB *et al.* 2002).

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



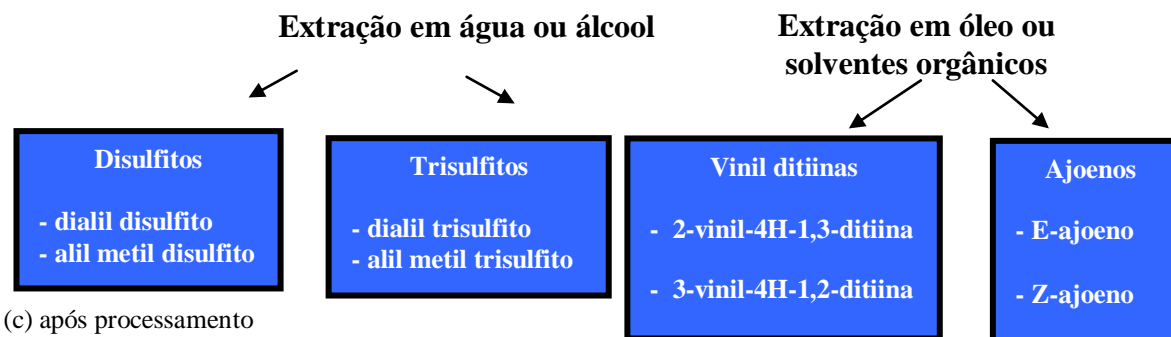
b) Picado ou macerado

Não ocorre reação durante o processamento (picar e macerar)



c) Longo tempo de extração em água

S-alilcisteína (SAC)
S-1-propenilcisteína



(a) bulbos intactos, (b) depois de picado ou macerado e (c) após processamento

Fonte: HOLUB 2002

Figura 6 - Reações químicas dos principais compostos organosulfurados encontrados no alho.

2.1.2.2 Compostos organosulfurados em alho fresco picado

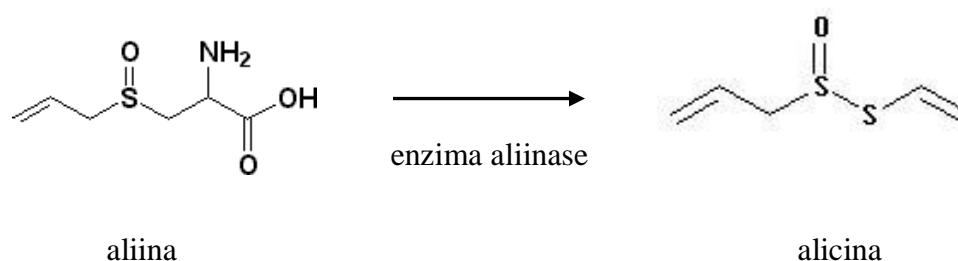
Quando o alho é picado mecanicamente, a enzima alliinase cataliza a conversão dos sulfóxidos de cisteína para tiosulfinatos, reação intermediada pelo ácido sulfênico (BLOCK 1992; LANZOTTI 2006), conforme apresentado na Figura 6, item b. Esta enzima é aproximadamente 10 vezes mais abundante nos dentes de alho do que nas folhas e é responsável por pelo menos 10% do total de proteínas dos dentes de alho (ELLMORE e FELDBERG 1994; HOLUB *et al.* 2002). A atividade da allinase é dependente do pH e da temperatura, tendo uma atividade ótima 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 biológicas. Estes 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 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 *et al.* 2002).

Os tiosulfinatos passam por várias transformações para formarem outras substâncias estáveis, como os di e trissulfetos, vinil ditiinas e ajoenos (Figura 6, item c) (HOLUB *et al.* 2002; OMAR e Al-WABEL 2010). Estas reações são dependentes de temperatura, pH e condições de solventes. A extração 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 extraídos em água ou álcool, diferentes produtos são formados como, disulfetos, trissulfetos, além dos ajoenos e vinil ditiinas (HOLUB *et al.* 2002; LANZOTTI 2006).

A alicina é o composto ativo mais conhecido do alho. Esta substância é produzida pela interação do aminoácido não protéico aliina, abundante nos dentes de alho, com a enzima aliinase (Figura 7) (OMAR e Al-WABEL 2010). Sua formação é influenciada pela maceração, pelo processo de secagem, pela temperatura em que o alho é seco e pela umidade, além de diferenças de solo (KRIS-ETHERTON *et al.* 2002; BAGHALIAN *et al.* 2005). A alicina tem propriedade antioxidante por sequestrar o radical hidroxila (XIAO e PARKIN 2002).

Figura 7 - Formação do composto organosulfurado alicina.



2.1.3 Fitosteróis

Os fitosteróis (FS) são componentes naturais derivados de plantas e têm papel fundamental na estrutura e funcionamento das membranas celulares, conferindo rigidez, regulando sua fluidez e permeabilidade (GUARDIOLA *et al.* 2002; MOREAU *et al.* 2002). Adicionalmente à sua importância na manutenção das funções da membrana celular, os fitosteróis são precursores de um grupo de fatores de crescimento dos vegetais (MOREAU *et al.* 2002).

São biosinteticamente derivados do esqualeno e pertencem ao grupo dos triterpenos (MOREAU *et al.* 2002). São compostos por um anel tetracíclico ciclopenta-fenantreno e uma longa e flexível cadeia lateral no carbono C₁₇ (BIERDMANN *et al.* 1993). Os FS contêm o mesmo esqueleto principal (Figura 8), mas diferem em relação aos grupamentos metila ou etila adicionais presentes na cadeia lateral. São categorizados em Δ^5 , Δ^7 e $\Delta^{5,7}$ -esteróis de acordo com a posição da ligação dupla no anel B (PIIRONEN *et al.* 2000). Podem ser divididos em três

subgrupos principais, baseados no número de grupamentos metila existentes em C₄: 4-desmetil esteróis, 4 α -monometil esteróis e 4,4-dimetil esteróis (JOHNSSON 2004), sendo os 4-desmetil esteróis os principais FS. Além do sitosterol, outros desmetil esteróis significativos incluem o estigmasterol, campesterol, Δ^5 -avenasterol, Δ^7 -avenasterol e Δ^7 -estigmasterol (Figura 9) (BIERDMANN *et al.* 1993; DUTTA *et al.* 1996).

Figura 8 - Esqueleto principal dos esteróis.

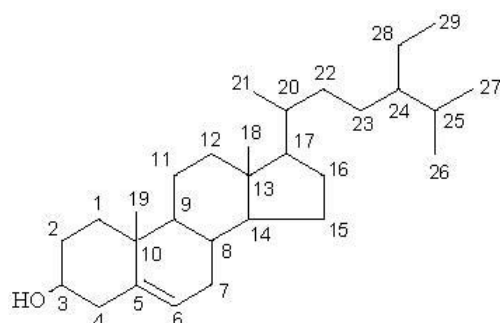
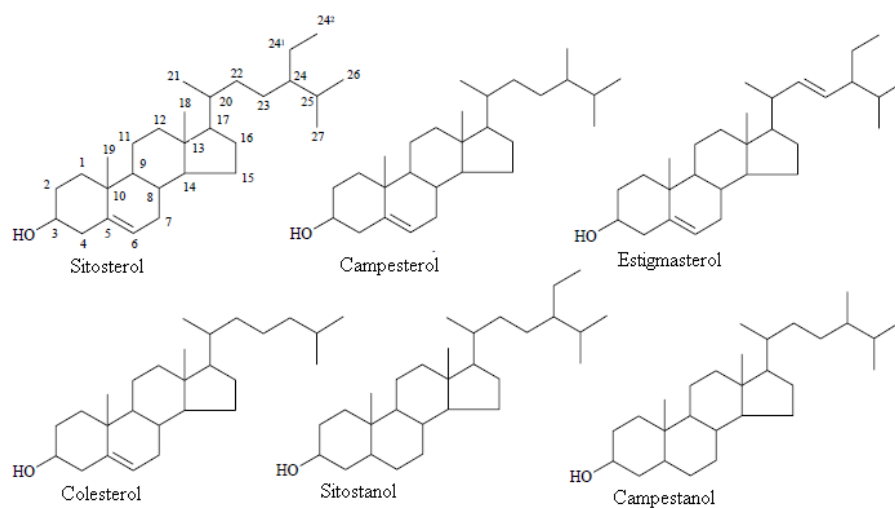


Figura 9 - Semelhanças estruturais entre o colesterol e os fitosteróis.



Fonte: Soupas 2004.

Os FS estão presentes exclusivamente em produtos de origem vegetal na forma livre ou esterificada aos ácidos graxos livres, ácidos fenólicos ou açúcares (AKIHISA *et al.* 1991). Eles são reconhecidos como compostos funcionais por apresentarem propriedades hipocolesterolêmicas (KRIS-ETHERTON *et al.* 2002; CHEN *et al.* 2008). O mecanismo de ação dos FS em relação à redução das concentrações plasmáticas de colesterol envolve a inibição intestinal de absorção do colesterol e diminuição da síntese de colesterol hepático (NORMÉN 2002; CHEN *et al.* 2008; RYAN *et al.* 2009). Uma dieta balanceada fornece de 200 a 400 mg de fitosteróis, mas a ingestão de 3 a 4 g/dia destes promove a redução do LDL colesterol em 10 a 15% (SALGADO *et al.* 2008).

Segundo o estudo HAN *et al.* (2008), o alho contém 11,2 mg/100g (base úmida) de fitosteróis em sua composição.

2.2 Propriedades bioativas do alho

2.2.1 Potencial antioxidante

O potencial antioxidante das plantas da família *Allium* tem sido motivo de vários estudos. Especialmente, alhos e seus diferentes extratos têm demonstrado este potencial em diferentes modelos *in vitro* e *in vivo* (BALASENTHIL *et al.* 2000; WU *et al.* 2001; KAUR e KAPPOR *et al.* 2002; YIN *et al.* 2002; HOLUB *et al.* 2002; WETTASINGHE *et al.* 2002; NUUTILA *et al.* 2003; HIGUCHI 2003; SARAVANAN *et al.* 2004; DURAK *et al.* 2004; BENKEBLIA 2004; TSAI *et al.* 2005; BHAGYALAKSHMI *et al.* 2005; GORINSTEIN *et al.* 2005; PEDRAZA-CHAVERRI *et al.* 2006; GORINSTEIN *et al.* 2006a; GORINSTEIN *et al.* 2006b; GORINSTEIN *et al.* 2006c; LEELARUNGRAYUB *et al.* 2006; PEDRAZA-CHAVERRI *et al.* 2007; JASTRZEBSKI *et al.* 2007; BOZIN *et al.* 2008; QUEIROZ *et al.* 2009; GORINSTEIN *et al.* 2009; GORINSTEIN *et al.* 2010).

A propriedade antioxidante do alho é atribuída aos compostos fenólicos, como a quercetina (MIEAN e MOHAMED 2001; LANZOTTI 2006) e aos compostos organosulfurados e seus precursores, como a alicina, S-alilcisteína, S-

alilmercaptocisteína, dialil sulfito - DAS, dialil dissulfito - DADS e dialil trissulfito - DATS (EGEN *et al.* 1992; KIM *et al.* 1997; LAMPE 1999; BOREX 2001; WU *et al.* 2001; XIAO e PARKIN 2002; YIN *et al.* 2002; PEDRAZA-CHAVERRÍ *et al.* 2007).

Vários estudos demonstraram que o alho, seja ele *in natura* ou processado, possui potencial antioxidante.

LAWSON *et al.* (1998), citado por NUUTILA *et al.* (2003) verificaram em modelo animal que a alicina em baixa concentração foi responsável pelo potencial antioxidante.

WU *et al.* (2001) verificaram que a atividade da enzima antioxidante, glutathione redutase, aumentou quando os animais receberam óleo de alho ou compostos organosulfurados DAS, DADS e DATS, sendo que o aumento maior foi para o grupo que recebeu DATS.

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 α -tocoferol, apresentaram resultados diferentes. O SEC e o NAC apresentaram menor poder redutor do que o α -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 é rico no composto organosulfurado, S-alicisteína (SAC), derivado da substância γ -glutamilcisteína, que possui propriedades antioxidantes. Para obter este produto, o alho foi incubado em 15 a 20% de etanol/água por 18 a 20 meses, onde o odor é removido. Este extrato não contém sulfóxidos 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 β -caroteno em torno de 30 %.

KAUR e KAPOOR (2002) determinaram a atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico de diferentes vegetais, incluindo o alho *in natura*. Os autores obtiveram dois extratos de alho, sendo um aquoso e o outro etanólico 80%. Os resultados demonstraram que ambos os extratos inibiram a oxidação lipídica em torno de 62%.

O composto organosulfurado 3,4-diidro-3-vinil-1,2-ditiina demonstrou alto potencial antioxidante, pois protegeu a partícula LDL-colesterol contra a oxidação, testes realizados *in vitro* (HIGUCHI *et al.* 2003).

No estudo de NUUTILA *et al.* (2003) foi verificado que o alho originário da Hungria apresentou capacidade antioxidante, pois este inibiu 25% a oxidação lipídica, utilizando uma concentração de 1000 mg/mL.

SARAVANAN *et al.* (2004) observaram que a atividade das enzimas antioxidantes, glutathione peroxidase, glutathione reductase, superóxido dismutase e catalase, aumentou quando os animais receberam 75 mg/kg/dia de óleo de alho em um período de 60 dias.

Em seu estudo, BENKEBLIA (2004) verificou a capacidade que os extratos de *Allium* possuem em remover o peróxido de hidrogênio. O autor concluiu que o extrato de alho removeu cerca de 90% dos peróxidos de hidrogênio.

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

GORINSTEIN *et al.* (2006c) avaliando a suplementação de alho cru e cozido em diferentes tempos de cocção (20, 40 e 60 minutos) sobre a atividade antioxidante em plasma de animais, verificaram que tanto os grupos que receberam suplemento de alho cru e cozido por 20 minutos houve aumento desta capacidade em 13,9% e 12,5%, respectivamente.

De acordo com LEELARUNGRAYUB *et al.* (2006) o alho apresentou potencial antioxidante pelo método de descoloração do radical 2,2'-azinobis-ABTS⁺, sendo que para o extrato hexânico este potencial foi maior quando comparado ao extrato aquoso.

2.2.2 Outras propriedades

Entre as propriedades benéficas identificadas do alho, foram descritas: redução da pressão arterial sistêmica; redução das concentrações séricas de LDL-c

e triacilgliceróis, aumento da atividade fibrinolítica e inibição da agregação plaquetária. Porém, os estudos diferenciam no tipo de preparação (*in natura* ou extraído em água ou óleo de alho) e dosagem, além de serem diferenciados em aspectos metodológicos, levando, muitas vezes, a resultados conflitantes. O Quadro 2 resume alguns estudos que avaliaram estas propriedades bioativas do alho.

Quadro 2 - Propriedades bioativas do alho.

Forma de administração do alho	Objetivo	Características	Resultados	Autores
<i>In natura</i> ½ a 1 dente de alho / dia	Colesterol e pressão arterial	Meta-análise de 5 estudos.	Redução de 9 a 12% do colesterol total e 9 % da pressão arterial	WARSHAFSKY <i>et al.</i> (1993)
Alho em pó (600 – 900 mg/dia) ou alho fresco (10 – 20 g/dia), de 1 a 10 meses	Colesterol	Meta-análise de 16 estudos, 592 indivíduos,	Redução de 12% do colesterol, a partir da quarta semana	SILAGY E NEIL (1994)
Extrato de alho	Agregação Plaquetária	Duplo-cego, randomizado, placebo-controlado	Sem efeito	MORRIS <i>et al.</i> (1995)
Extrato de alho envelhecido (7,2 g), 6 meses	Colesterol, lipoproteína e pressão arterial	Duplo-cego, cross over, homens moderadamente hipercolesterolêmicos	Redução de 6% no colesterol total, 4% na LDL e 5,5% na pressão sistólica	STEINER <i>et al.</i> (1996)
Óleo de alho destilado a vapor (5 mg, 2x/dia)	Lipoproteínas, absorção e síntese do colesterol	Duplo-cego, randomizado	Sem efeito	BERTHOLD <i>et al.</i> (1998)
900 mg/dia de alho em pó (Kwai) 12 semanas	Colesterol	Randomizado, placebo-controlado, pacientes hipercolesterolêmicos	Sem efeito	ISAACSHON <i>et al.</i> (1998)
300 mg de extrato de alho, 3x/dia, 8 semanas	Colesterol, lipoproteínas,	30 pacientes (8 – 18 anos), hiperlipidêmicos (tipo familiar)	Sem efeito	McCRINDLE <i>et al.</i> (1998)
10 g de alho/dia, período de 4 meses	Colesterol, pressão arterial	23 voluntários hipercolesterolêmicos, sendo 13 hipertenso e 13 normotenso	Redução do nível de colesterol LDL, VLDL, triacilgliceróis e aumento do HDL. Diminuição significativa da PA do grupo hipertenso	DURAK <i>et al.</i> (2004)

Continuação

continuação

Forma de administração do alho	Objetivo	Características	Resultados	Autores
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)	Atividade protetora gástrica	Modelo animal: ratos Wistar, 5 grupos com 12 animais em cada.	Doses de 0,25 e 0,5 mg/Kg causou diminuição de úlceras	KHOSLA <i>et al.</i> (2004)
1 mg de extrato hidroalcolico seco de alho, dosados no tempo 0, 15, 30, 45, 60 e 120 segundos	Pressão arterial	Modelo animal: ratos machos com peso em média de 400 g e em jejum de 12 horas	Redução de 19% da pressão arterial média	SINGI <i>et al.</i> (2005)
25 mg/kg de extrato de alho cru (C) e cozido por 20 minutos (Z) liofilizados por 30 dias	Redução da fração LDL-c e dos triacilgliceróis (TG)	Modelo animal: ratos Wistar	A suplementação com alho Z e C reduziu a LDL-c em 34% e 43%, respectivamente e em 18 e 24% os TG	JASTRZEBSKI <i>et al.</i> (2007)

A hipercolesterolemia é o principal fator de risco para as doenças cardiovasculares. Vários estudos verificaram que o alho e seus produtos possuem um efeito hipolipemiante (WARSHAFSKY *et al.* 1993; SILAGY e NEIL 1994; BORDIA *et al.* 1998; ALI *et al.* 2000; AOUADI *et al.* 2000; DURAK *et al.* 2004; KIM *et al.* 2005; GORINSTEIN *et al.* 2006b; GORINSTEIN *et al.* 2006c; JASTRZEBSKI *et al.* 2007; GORINSTEIN *et al.* 2010).

Para investigar a relação entre as disfunções do metabolismo do colesterol e a aterogênese, diversos modelos animais têm sido utilizados. Estes modelos têm sido de grande importância para a compreensão da etiologia da aterosclerose. O hamster é proposto como a espécie ideal para o estudo do metabolismo lipídico, uma vez que é considerada mais próxima dos humanos quanto ao metabolismo de lipídios, lipoproteínas e ácidos biliares (SPADY e DIETSCHY 1983; SUCKLING *et al.* 1991). Quando comparado a outros modelos animais, os hamsters possuem uma série de vantagens: 1) como em humanos, o principal transportador plasmático de colesterol é a LDL; 2) o gene do receptor de LDL de hamster foi isolado e caracterizado, mostrando forte similaridade com o gene humano; 3) as placas

ateroscleróticas se desenvolvem principalmente no arco aórtico (SIMA *et al.* 2001). Além disso, estes animais desenvolvem hipercolesterolemia e aterosclerose semelhante à humana quando alimentados com dietas ricas em colesterol e ácidos graxos saturados.

2.3 Influência do processamento dos alimentos no teor de compostos bioativos, no potencial antioxidante e na formação de novos produtos

O teor de compostos bioativos das frutas e hortaliças depende da forma como o alimento é consumido, seja na forma *in natura* ou processado. KAUR e KAPOOR (2001) e JASTRZEBSKI *et al.* 2007 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 do potencial antioxidante, dependendo de muitos fatores, como: estrutura química, potencial de oxiredução e possíveis interações com outros componentes do alimento (NICOLI *et al.* 1999; JASTRZEBSKI *et al.* 2007; LAGUERRE *et al.* 2007).

Normalmente, o alho é consumido na forma cozida em alimentos e tem sido demonstrado que o aquecimento pode afetar diversas propriedades, incluindo as propriedades antioxidantes (MONTANO *et al.* 2004; GORINSTEIN *et al.* 2006b).

GORINSTEIN *et al.* (2006b) e GORINSTEIN *et al.* (2006c) observaram que tanto no extrato aquoso de alho cru e cozido (por 20 minutos) houve aumento da capacidade antioxidante no plasma de ratos (13,9% e 12,5%, respectivamente), sugerindo que as propriedades antioxidantes do alho não foi afetada pela cocção, porém quando o alho foi cozido por 40 ou 60 minutos, esta capacidade reduziu, assim como no estudo de JASTRZEBSKI *et al.* (2007).

SHOBANA e NAIDU (2000) constataram que a capacidade do alho em inibir a peroxidação lipídica não foi afetada pela cocção (30 minutos a 100°C). Assim como o estudo de PEDRAZA-CHAVERRÍ *et al.* (2007) foi verificado que, tanto no alho em pó quanto no alho cru antes e após o aquecimento por 30 minutos, a capacidade antioxidante avaliada pela remoção de peroxinitrito ficou estável, porém quando o alho foi colocado em microondas por 30 segundos essa capacidade

diminuiu significativamente. Já os estudo de JIMÉNEZ-MONREAL *et al.* (2009) observaram que quando o alho foi cozido (30 minutos) ou frito (8 minutos) a capacidade antioxidante foi reduzida em torno de 60%.

QUEIROZ *et al.* (2009) avaliando a atividade antioxidante *in vitro* do extrato metanólico do alho *in natura* e de seus diferentes produtos comercializados (alho frito, picado com sal, picado sem sal e misto), verificaram que a fritura do alho não reduziu a atividade antioxidante em três modelos diferentes (ensaio DPPH, sistema β -caroteno/ácido linoléico e avaliação da capacidade protetora da oxidação lipídica utilizando o aparelho Rancimat[®]), porém no estudo de GORINSTEIN *et al.* (2010) foi observado que o potencial antioxidante (pelos métodos FRAP e radical 2,2'-azinobis-ABTS⁺) do alho cozido por 10 minutos é o mesmo do cru, porém quando frito por 10 minutos esta propriedade foi reduzida.

Além disso, foi demonstrado que a capacidade de extratos de alho em inibir a oxidação de lipoproteínas no soro humano não foi afetada pelo aquecimento (cocção ou microondas) dos dentes de alho, antes e após o corte (PEDRAZA-CHAVERRÌ *et al.* 2004). YIN e CHENG (1998) constataram que o tratamento térmico (100°C por 15 minutos em forno) reduziu a capacidade de inibir a peroxidação lipídica no alho. O aquecimento por microondas destruiu a atividade da enzima allinase em 1 minuto, a qual contribui com a capacidade antioxidante desta especiaria (SONG e MILNER 1999). No estudo de LANZOTTI (2006) foi verificado que a quercetina diminuiu com a fritura do alho.

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 as melanoidinas que são produtos da reação de Maillard (PRM) (NICOLI *et al.* 1997; NICOLI *et al.* 1999; KAUR e KAPOOR 2001), mas por outro lado, também podem ser formados compostos potencialmente tóxicos e diminuir o valor nutricional de alimentos, devido ao comprometimento de aminoácidos essenciais, notadamente a lisina.

Na reação de Maillard, compostos α -dicarbonílicos reagem facilmente com os grupamentos amina de proteínas, originando produtos estáveis chamados produtos da reação de Maillard, os quais têm implicação em modificações fisiopatológicas que ocorrem na diabetes, aterosclerose e doenças

neurodegenerativas (SASAKI *et al.* 1998; GUGLIUCCI 2000; SOMOZA 2005; NASS *et al.* 2007; XANTHIS *et al.* 2007).

Visto que consideráveis concentrações de PRM são produzidos durante o processamento térmico, trabalhos recentemente publicados discutem a relação entre os PRM presentes nos alimentos atuando como glicotoxinas nos organismos (BUETLER 2008). Ainda assim, o papel dos PRM presentes nos alimentos/dietas na saúde é pouco conhecido e há controvérsias a este respeito (XANTHIS *et al.* 2007; MONNIER 2007; BAYNES 2007).

Como o alho é uma especiaria rica em substâncias bioativas, possui potencial antioxidante e efeito hipolipemiante, o presente estudo teve como objetivo avaliar se o processamento térmico (cocção e fritura) reduz o teor de seus compostos bioativos e o seu potencial antioxidante *in vitro* e *in vivo* em hamsters hipercolesterolemizados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

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

Akihisa T, Kokke WC, Tamura T. Naturally occurring sterol and related compounds from plants. In: Physiology and Biochemistry of Sterols. Petterson & Ness (Editors). Champaign: AOCS Press, 1991. p.172-228.

Ali M, Al-Qattan KK, Al-Enezi F, Khanafer RMA, T Mustafa. Effect of allicin from garlic powder on serum lipids and blood pressure in rats fed with a high cholesterol diet. Prostag, Leukot Essential Fatty Ac 2000;62(4):253-59.

[ANAPA] Associação Nacional de Produtores de Alho. Conjuntura do alho. Marco Antônio Lucini. Disponível em: <http://www.anapa.com.br/principal/index.php/producao-nacional> (31 de agosto de 2009).

Aouadi R, Aouidet A, Elkadhi A, Ben Rayana C, Jaafoura H, Tritar B, Nagati K. Effect of fresh garlic (*Allium sativum*) on lipid metabolism in male rats. Nutr Res 2000;20(2):273-80.

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 Horticult 2005;103(2):155-66.

Balasantil S, Arivazhagan S, Nagini S. Effect of garlic on circulatory oxidant and antioxidant status during 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat oral carcinogenesis. Nut 2000;20(11):1581-89.

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

Barzilai A, Yamamoto KI. DNA damage responses to oxidative stress. DNA Repair 2004;(8-9):1109-15.

Baynes JW, Dominiczak MH. Bioquímica médica. 2ª edição. São Paulo: Editora Manole; 2007.

Benkeblia N. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). Lebensm-Wiss Technol 2004;37:263-68.

* De acordo com as normas do Guia de Apresentação de Teses. Biblioteca/CIR – Centro de Informação e referência em Saúde Pública. 2 ed. São Paulo; 2006.

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

Bhagyalakshmi N, Thimmaraju R, Venkatachalam L, Murthy K, Sreedhar R. Nutraceutical applications of garlic and the intervention of biotechnology. *Crit Rev Food Sci Nut* 2005;45:607-21.

Biedermann M, Konrad G, Mariani C. Transesterification and on-line LC-GC for determining the sum of free and steriefied sterols in edible oils and fats. *Fat Sci Technol* 1993;95:127-33.

Block E. The chemistry of garlic and onions. *Sci Am* 1985;252:114-19.

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

Bordia A, Verma SK, Srivastava KC. Effect of garlic (*Allium sativum*) on blood lipids, blood sugar, fibrinogen and fibrinolytic activity in patients with coronary artery disease. *Prostag, Leukot Essential Fatty Ac* 1998;58(4):257-63.

Borex C. Antioxidant health effects of aged garlic extract: Recent advances on the nutritional effects associated with the use of garlic as a supplement. *The J Nut* 2001;131(3S):1010-15.

Bozin B, Mimica-Dukic N, Samojlik I, Goran A, Igetic R. Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae). *Food Chem* 2008;111:925-29.

Bravo L, Saura-Calixto F. Characterization of dietary fiber and the *in vitro* indigestible fraction of grape pomace. *Am J Enol Vitic* 1998;49(2):135-41.

Buetler T. Dicarbonyls in coffee. *IMARS Highlights* 2008;2(7):5-7.

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

Cardozo EL, Cardozo-Filho L, Ferrarese-Filho O, Fernando ZE. Selective Liquid CO₂ Extraction of Purine Alkaloids in Different *Ilex paraguariensis* Progenies Grown under Environmental Influences. *J Agric Food Chem* 2007;55(17):6835-41.

Chen Z-Y, Jiao R, Ma KY. Cholesterol-Lowering Nutraceuticals and Functional Foods. *J Agri. Food Che.* 2008;56:8761-73.

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

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

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

Dutta PC, Przybylski R, Appelqvist LA. Formation and analysis of oxidized sterols in frying fat. In: *Deep frying. Chemistry, nutrition and practical applications*. Perkins & Ericsson (Editors). Champaign: AOCS Press, 1996. p.112-150.

Egen-Schwind C, Eckard R, Kemper FH. Metabolism of garlic constituents in the isolated perfused rat liver. *Planta Med* 1992;58:301-05.

Ellmore GS, Feldberg RS. Alliinase localization in the bundle sheaths 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 1676-40.

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

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

Gorinstein S, Drzewiecki J, Leontowicz H, Leontowicz M, Najman K, Jastrzebski Z, Zachwieja Z, Barton H, Sthabsky B, Katrich H, Trakhtenberg S. Comparison of the bioactive and antioxidant potentials of fresh and cooked Polish, Ukrainian, and Israeli garlic. *J Agric Food Chem* 2005;53:2726-32.

Gorinstein S, Leontowicz M, Leontowicz H, Jastrzebski Z, Drzewiecki J, Namiesnik J, Zachwieja Z, Barton H, Zev T, Katrich H, Trakhtenberg S. Dose-dependent influence of commercial garlic (*Allium sativum*) on rats fed cholesterol-containing diet. *J Agric Food Chem* 2006a;54:4022-27.

Gorinstein S, Leontowicz H, Leontowicz M, Drzewiecki J, Najman K, Katrich E, Barasch D, Yamamoto K, Trakhtenberg S. Raw and boiled garlic enhances plasma antioxidant activity and improves plasma lipid metabolism in cholesterol-fed rats. *Life Sc* 2006b;78(6):655-63.

Gorinstein S, Leontowicz M, Leontowicz H, Najman K, Namiesnik J, Park Y-S, Jung S-T, Kang S-G, Trakhtenberg S. Supplementation of garlic lowers lipids and increases antioxidant capacity in plasma of rats. *Nut Res* 2006c;26(7):362-68.

Gorinstein S, Jastrzebski Z, Leontowicz H, Leontowicz M, Namiesnik J, Najman K, Park Y-S, Heo B-G, Cho J-Y, Bae J-H. Comparative control of the bioactivity of

some frequently consumed vegetables subjected to different processing conditions. *Food Contr* 2009;20(4):407-13.

Gorinstein S, Leontowicz H, Leontowicz M, Jastrzebski Z, Najman K, Tashma Z, Katrich E, Heo B-G, Cho J-Y, Park Y-J, Trakhtenberg S. The Influence of Raw and Processed Garlic and Onions on Plasma Classical and Non-classical Atherosclerosis Indices: Investigations *In Vitro* and *In Vivo*. *Phytother Res* 2010;24:706-14.

Guardiola F, Dutta P, Codony R, Savage GP. (Editors). Cholesterol and phytosterol oxidation products: analysis, occurrence, and biological effects. In: Guardiola, F, Dutta P, Codony R, Savage GP. Eds.; Publisher: AOAC 2002. p.1-394.

Gugliucci A. Glycation as the glucose link to diabetic complications. *JAOA* 2000;100:621-34.

Gutterige JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995;41(12):1819-28.

Hagerman AE, Zhao Y, Johnson S. Antinutrients and Phytochemicals in Food. *Am Chem Soc* 1997;12:209-22.

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

Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans* 2007;35(5):1147-50.

Han X, Shen T, Lou H. Dietary polyphenols and their biological significance. *Int J Mol Sci* 2007;8:950-88.

Han J-H, Yang Y-X, Feng M-Y. Contents of Phytosterols in Vegetables and Fruits Commonly consumed in China. *Biomedical and Environmental Sciences* 2008;21(6):449-53.

Heermann K. Flavonols and flavones in food plants: a review. *J Food Techn* 1976;11:433-48.

Higuchi O, Tateshita K, Nishimura H. Antioxidative Activity of Sulfur-Containing Compounds in *Allium* Species for Human Low-Density Lipoprotein (LDL) Oxidation *in vitro*. *J Agric Food Chem* 2003;51:7208-14.

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). p.213-79.

Isaacshon JL, Moser M, Stein EA, Dudley K, Davey JA, Liskov E, Black HR. 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, 2008. [Tese de Doutorado - Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo/USP].

Jastrzebski Z, Leontowicz H, Leontowicz M, Namiesnik J, Zachwieja Z, Barton H, Pawelzik E, Arancibia-Avila P, Toledo F, Gorinstein S. The bioactivity of processed garlic (*Allium sativum* L.) as shown *in vitro* and *in vivo* studies on rats. Food and Chem Toxicol 2007;45:1626-33.

Jiménez-Monreal AM, García-Diz L, Martínez-Tomé M, Mariscal M, Murcia MA. Influence of cooking methods on Antioxidant Activity of Vegetables. J Food Sci 2009;74(3):H97-H103.

Johnsson L. Phytosterol oxidation products: formation, analysis and occurrence. Doctoral thesis. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 2004. p.58.

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.

Kim SM, Kubota K, Kobayashi A. Antioxidant activity of sulfur-containing flavor compounds in garlic. Biosc, Biotechnol and Biochem 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.

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

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 Am J Medic 2002;113(9B):71-88.

Kwak MK, Wakabayashi N, Kensler TW. Chemoprevention through the Keap1-Nrf2 signaling pathway by phase II enzyme inducers. Mutat Res 2004;555 (1/2):133-48.

Laguerre M, Lecomte J, Villeneuve P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. Progress in Lipid Res 2007;46:244-82.

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

Lange W. Cholesterol, Phytosterol, and Tocopherol Content of Food Products and Animal Tissues. *J Am Oil Chem Soc* 1950;414-22.

Lanzotti V. The analysis of onion and garlic. *J Chromat* 2006;1112:3-22.

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. p.306-30.

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

Leelarungrayub N, Rattanapanon V, Chanarat N, Gebicki JM. Quantitative evaluation of the antioxidant properties of garlic and shallot preparations. *Nut* 2006;22(3):266-74.

Marklund SL. Extracellular superoxide dismutase in human tissues and human cell lines. *J Clin Investig* 1984;74:1398-403.

Martinello F, Soares SM, Franco JJ, Santos AC, Sugohara A, Garcia SB, Curti C, Uyemura AS. Hypolipemic and antioxidant activities from *Tamarindus indica* L. pulp fruit extract in hypercholesterolemic hamsters. *Food Chem Toxicol* 2006;44:810-18

Matsumoto RLT, BASTOS DHM. Effects of Mateé Tea (*Ilex paraguariensis*) Ingestion on mRNA Expression of Antioxidant Enzymes, Lipid Peroxidation, and Total Antioxidant Status in Healthy Young Women. *J Agric Food Chem* 2009;57:1775-80.

Mazza G. Anthocyanins on grapes and grape products. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1995;35(4):341-71.

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

Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 1994;17(3):235-48.

Miean KH, Mohamed S. Flavonoid (Myricetin, Quercetin, Kaempferol, Luteolin, and Apigenin) Content of Edible Tropical Plants. *J Agric Food Chem* 2001;49:3106-12

Monnier VM. Dietary advanced lipoxidation products as risk factors for human health – a call for data. *Mol Nutr Food Res* 2007;51:1091-93.

Montano A, Casado FJ, Castro A, Sanchez AH, Rejano L. Vitamin content and amino acid composition of picked garlic processed with and without fermentation. *J Agric Food Chem* 2004;52:7324-30.

Moreau RA, Whitaker BD, Hicks KB. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Prog Lipid Res* 2002;41: 457-500.

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. *Clin Experim Pharm Phys* 1995;22:414-17.

Nass N, Barling B, Santos NA, Scheubel RJ, Bögermann J, Silber RE, Simm A. Advanced glycation end products, diabetes and ageing. *Zeitschrift für Gerontologie and Geriatrie* 2007;40: 349-56.

Nawar WW. Lipids. In: Fennema OR (Ed) *Food Chemistry*. New York: Marcel Dekker, Inc. 1996;49. p.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. *Trends Food Sci Technol* 1999;10:94-100.

Niki E. Antioxidants and atherosclerosis. *Biochem Soc Transact* 2004;32:156-9.

Niki E. Assessment of Antioxidant Capacity *in vitro* and *in vivo*. *Free Rad Biol Med* 2010;49:503-15.

Normén L, Brygelson S, Johnson M, Dutta P. The phytosterols contents some cereal foods commonly consumed in Sweden and in the Netherlands. *J Food Comp Anal* 2002;15:693-704.

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 Chem* 2003;81:485-93.

Oliveira CM, Souza RJ, Mota JH. Determination of the harvest date for garlic cultivars. *Hortic Bras* 2003;21(3):506-09.

Oliveira CM, Souza RJ, Yuri JE. Harvest date and storage potential in garlic cultivars. *Hortic Bras* 2004;22(4):804-07.

Omar SH, Al-Wabel NA. Organosulfur compounds and possible mechanism of garlic in cancer. *Saudi Pharmac J* 2010;18:51-8.

Pedraza-Chaverrí J, Gil-Ortiz M, Albarran G, Barbachano-Esparza L, Menjivar M, Medina Campos ON. Garlic's ability to prevent in vitro Cu⁺²-induced lipoprotein oxidation in human serum is preserved in heated garlic: effect unrelated to Cu²⁺-chelation. *Nutr J* 2004;3:10.

Pedraza-Chaverrí J, Medina-Campos ON, Avila-Lombardo R, Berenice Z-BA, Orozco-Ibarra M. Reactive oxygen species scavenging capacity of different cooked garlic preparations. *Life Sci* 2006;78:761-70.

Pedraza-Chaverrí J, Medina-Campos ON, Segoviano-Murillo. Effect of heating on peroxynitrite scavenging capacity of garlic. *Food and Chem Toxicol* 2007;45:622-27.

Peleg H, Naim M, Rouseff RL, Zehavi U. Distribution of bound and free phenolic acid in oranges (*Citrus sinensis*) and grapefruits (*Citrus paradisi*). *J Sci Food Agric* 1991;57(3):417-26.

Piironen V, Lindsay DG, Miettinen TA, Toivo J, Lampi AM. Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *J Sci Food Agric* 2000;80:939-66.

Pincemail J. How to evaluate your oxidative stress. 2003. Disponível em: http://www.probiox.com/uk/html/body_stressoxydant.htm.

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

Queiroz YS, Ishimoto EY, Bastos DHM, Sampaio GR, Torres EAFS. Garlic (*Allium sativum* L.) and ready-to-eat garlic products: *in vitro* antioxidant activity. *Food Chem* 2009;115(1):371-74.

Ryan E, McCarty FO, Maguire AR, O'Brien NM. Phytosterol oxidation products: their formation, occurrence, and biological effects. *Food Rev Int* 2009;25:157-74.

Salgado JM, Bin C, Mansi DN, Souza A. Efeito do abacate (*Persea americana* Mill) variedade hass na lipidemia de ratos hipercolesterolêmicos. *Ciênc Tecnol Aliment* 2008;28(4):922-28.

Saravanan G, Prakash J. Effect of garlic (*Allium sativum*) on lipid peroxidation in experimental myocardial infarction in rats. *J Ethnopharmacol* 2004;94:155-58.

Sasaki N, Fukatsu K, Hayashi Y, Yoshida T, Fuji N, Koike T, Wakayama I, Yanagihara R, Garruto R, Amano N, Makita Z. Advanced Glycation End Products in Alzheimer's Diseases and other Neurodegenerative Diseases. *Am J Pathol* 1998;153(4):1149-55.

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. JR Coll Physicians Lond 1994;28(1):39-45.

Sima A, Stancu C, Constantinescu E, Oleganu L. and Simionescu M. The hyperlipemic hamster - a model for testing the antiatherogenic effect of amlodipine. J Cellular Mol Med 2001;5:153-62.

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. p. 20-33.

Singi 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.

Shobana S, Naidu KA. Antioxidant activity of selected Indian spices. Prostaglandins Lukot Essent Fatty Acids 2000;62:107-10.

Somoza V. Five years of research on health risks and benefits of Maillard reaction products: An update. Mol Nutr Food Res 2005;49:663-75.

Song K, Milner JA. Heating garlic inhibits its ability to suppress 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene-induced DNA adduct formation in rat mammary tissue. J Nutr 1999;129:657-61.

Soupas L, Juntunen L, Lampi AM, Piironen V. Effects of sterol structure, temperature, and lipid medium on phytosterol oxidation. J Agric Food Chem 2004;52:6485-91.

Spady DK, Dietschy JM. Sterol synthesis *in vivo* in 18 tissues of the squirrel monkey, guinea pig, rabbit, hamster, and rat. J Lipid Res 1983;24:303-15.

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.

Stocker R, Keaney-Jr J F. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. Physiol Rev 2004;84:1381-88.

Suckling KE, Benson GM, Bond B, Gee A, Glen A, Haynes C, Jackson B. Cholesterol lowering and bile acid excretion in the hamster with cholestyramine treatment. Atherosclerosis 1991;89:183-90.

[TACO] Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. (2006). Segunda Edição. Disponível em: http://www.unicamp.br/nepa/taco/contar/taco_versao2.pdf

Tan KH, Meyer DJ, Ketterer B. Thymine hydroperoxide, a substrate for rat Se-dependent glutathione peroxidase and glutathione transferase isoenzymes. *FEBS Letters* 1986;207:231-33.

Tsai T-H, Tsai P-J, Ho S-C. Antioxidant and anti-inflammatory activities of several commonly used spices. *J Food Sci* 2005;70(1):93-7.

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interac* 2006;160(1):1-40.

Vicente SJV. Caracterização antioxidante do café (*Coffea Arabica*, L) e efeitos da sua administração oral em ratos. São Paulo, 2009. [Tese de Doutorado - Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo/USP].

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.

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

Wu CC, Sheen LY, Chen H-W, Tsai S-J, Lii C-K.. Effects of organosulfur compounds from garlic oil on the antioxidation system in rat liver and red blood cells *Food and Chem Toxicol* 2001;39(6):563-69.

Xanthis A, Hatzitolios A, Koliakos G, Tatola V. Advanced glycosylation End Products and nutrition – a possible relation with diabetic atherosclerosis and how to prevent it. *J Food Sc* 2007;72:125-29.

Xiao H, Parkin KL. Antioxidant Functions of Selected *Allium* Thiosulfinates and S-Alk(en)yl-L-Cysteine Sulfoxides. *J Agric Food Chem* 2002;50:2488-93.

Yeh CT, Yen GC. Induction of hepatic antioxidant enzymes by phenolic acids in rats is accompanied by increased levels of multi-drug resistance-associated to protein 3 mRNA expressions. *J Nut* 2006;136:11-5.

Yin M, Cheng W. Antioxidant activity of several *Allium* members. *J Agric Food Chem* 1998;46:4097-101.

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.

CAPÍTULO 2

**ALHO CRU, COZIDO E FRITO:
CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL,
COMPOSTOS BIOATIVOS E POTENCIAL
ANTIOXIDANTE *IN VITRO***

1 INTRODUÇÃO

O aumento do consumo de frutas 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; DALLONGEVILLE *et al.* 2006; KNAI *et al.* 2006; VAINIO e WEIDERPASS 2006; GORINSTEIN *et al.* 2010). Este efeito protetor tem sido atribuído particularmente à presença de várias substâncias antioxidantes encontradas nestes alimentos, por exemplo, as vitaminas C e E, β -caroteno, polifenóis e compostos organosulfurados (NUUTILA *et al.* 2003; GORINSTEIN *et al.* 2010).

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; GORINSTEIN *et al.* 2005; GORINSTEIN *et al.* 2006a, GORINSTEIN *et al.* 2006b; JASTRZEBSKI *et al.* 2007; JIMÉNEZ-MONREAL *et al.* 2009; GORINSTEIN *et al.* 2010). Especialmente para o alho e seus diferentes extratos, observou-se que esta hortaliça possui potencial antioxidante em modelos *in vitro*, e este potencial é atribuído à variedade de compostos organosulfurados e seus precursores, além dos compostos fenólicos (KIM *et al.* 1997; NUUTILA *et al.* 2003; GORINSTEIN *et al.* 2005; GORINSTEIN *et al.* 2006a, GORINSTEIN *et al.* 2006b; JIMÉNEZ-MONREAL *et al.* 2009; GORINSTEIN *et al.* 2010). De acordo com KIM *et al.* (1997), a alicina, dialil disulfeto e dialil trissulfeto são alguns dos compostos organosulfurados voláteis presentes no alho com potencial antioxidante.

O potencial antioxidante das frutas e hortaliças depende da forma como o alimento é consumido, seja na forma *in natura* ou processado (PEDRAZA-CHAVERRÍ *et al.* 2007). 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 e possíveis interações com outros componentes do alimento (NICOLI

et al. 1999). O tratamento térmico pode induzir a formação de novos compostos que são produtos da reação de Maillard (PRM), sendo que alguns destes compostos são potencialmente tóxicos podendo diminuir o valor nutricional de alimentos devido ao comprometimento de aminoácidos essenciais, notadamente a lisina (NICOLI *et al.* 1997; NICOLI *et al.* 1999; KAUR e KAPOOR 2001).

O alho é consumido principalmente após o processamento térmico ao invés de cru que leva a certa diminuição no conteúdo de seus compostos bioativos e no seu potencial antioxidante (NICOLI *et al.* 1999; KAWAMOTO *et al.* 2004; PEDRAZA-CHAVERRÍ *et al.* 2006; PEDRAZA-CHAVERRÍ *et al.* 2007). Portanto é de suma importância verificar se a coção e a fritura do alho preservam o conteúdo dos seus compostos bioativos e o seu potencial antioxidante *in vitro*.

2 ASPECTOS ÉTICOS

Tendo em vista que este projeto não envolve seres humanos, foi encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública/ Universidade de São Paulo uma declaração informando tal fato, conforme normas de resolução 196 de 10/10/1996, do Conselho Nacional de Saúde, que regulamenta as pesquisas envolvendo seres humanos (Anexo 1).

3 ASPECTO AMBIENTAL

O projeto foi submetido ao comitê de Ética Ambiental da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo e foi aprovado (Anexo 2). Os resíduos produzidos durante as análises foram acondicionados adequadamente e recolhidos pela empresa AMBICAMP.

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Avaliar o efeito do tratamento térmico do alho sobre os seus compostos bioativos e seu potencial antioxidante *in vitro*.

4.2 Específicos

- ❖ Caracterizar nutricionalmente os alhos cru, cozido e frito, determinando a composição centesimal, o perfil de ácidos graxos, os teores de fibras alimentares solúvel e insolúvel e os teores de cobre, zinco e selênio;
- ❖ Quantificar os fenólicos totais, os compostos fenólicos quercetina, miricetina, apigenina, o composto organosulfurado alicina e os fitosteróis campesterol, stigmasterol e β -sitosterol;
- ❖ Verificar a formação dos compostos intermediários fluorescentes da reação de Maillard;
- ❖ Avaliar o potencial antioxidante *in vitro* de extratos das amostras utilizando três testes.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Reagentes e equipamentos

Os reagentes e os equipamentos utilizados neste projeto estão descritos no anexo 3.

5.2 Amostras

As amostras de alho *in natura* do cultivar São Valentin (5 caixas, contendo 10 kg cada) foram obtidas da Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo (CEAGESP) em fevereiro de 2008 no BOX AMG 11, 12 e 13.

Segundo o fornecedor de alho e as informações obtidas do rótulo do produto, o local de plantio das amostras fornecidas é a região de Curitibaanos – SC. A data de plantio foi julho de 2007 e a da colheita dezembro do mesmo ano, sendo que este produto chegou a CEAGESP em janeiro de 2008.

As amostras estavam armazenadas em caixas de papel, e constava na embalagem a seguinte classificação do produto: grupo nobre (até 20 dentes por cabeça); subgrupo 3 (casca roxa e película roxa); classe 6 (diâmetro horizontal entre 47 e 56 mm).

5.2.1 Peso médio dos dentes de alho

Os dentes de alho de 6 bulbos foram pesados. Na tabela 2, pode-se verificar o peso médio e a quantidade de dentes de alho. O número de dentes de alho dos bulbos variaram de 10 a 11. De acordo com a análise de variância, pode-se afirmar que não existe diferença estatisticamente significativa ($p = 0,127$) entre o peso médio dos dentes de alho.

Tabela 2- Número e peso médio (g) dos dentes de alho de 6 bulbos.

Peso dos dentes de alho (g)						
Dentes de alho	Bulbo 1	Bulbo 2	Bulbo 3	Bulbo 4	Bulbo 5	Bulbo 6
1	3,86	1,02	4,83	3,55	5,26	7,16
2	6,41	3,94	5,53	4,19	4,18	6,21
3	5,59	7,84	5,39	3,49	5,60	6,52
4	5,96	6,41	4,40	3,01	4,99	3,52
5	2,74	3,68	3,05	3,85	4,37	3,35
6	2,94	3,97	1,84	1,37	4,41	5,64
7	6,58	4,06	6,25	3,06	5,35	6,13
8	1,59	3,48	1,86	1,30	2,58	6,84
9	5,33	2,29	1,38	2,39	2,63	3,02
10	1,85	2,28	5,47	1,85	2,88	1,96
11	1,64	2,79		3,57		
Peso médio (g)	4,04	3,80	4,00	2,88	4,23	5,04
Desvio padrão	1,98	1,92	1,81	1,00	1,15	1,87

5.2.2 Processamento das amostras

Toda a etapa do processamento foi executada no laboratório de Técnica Dietética da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo.

Dos 50 kg de alho adquirido, restaram 37 kg após o descascamento manual (Figura 10). A perda de 13 kg foi devido a retirada da película e partes impróprias para o consumo (deteriorada). Para o processamento das amostras, os bulbos descascados foram pesados e divididos em 3 partes:

- crua: alho *in natura* triturado em processador;

- cozida em água a 100 °C por 30 minutos: para a cocção do alho foi adicionada água filtrada na proporção 1:1 (p/v). O tempo de 30 minutos para a cocção do alho foi escolhido baseado na média de cocção do arroz segundo o Comunicado Técnico 84 da Embrapa (2004). A água de cocção foi liofilizada juntamente com a amostra cozida;

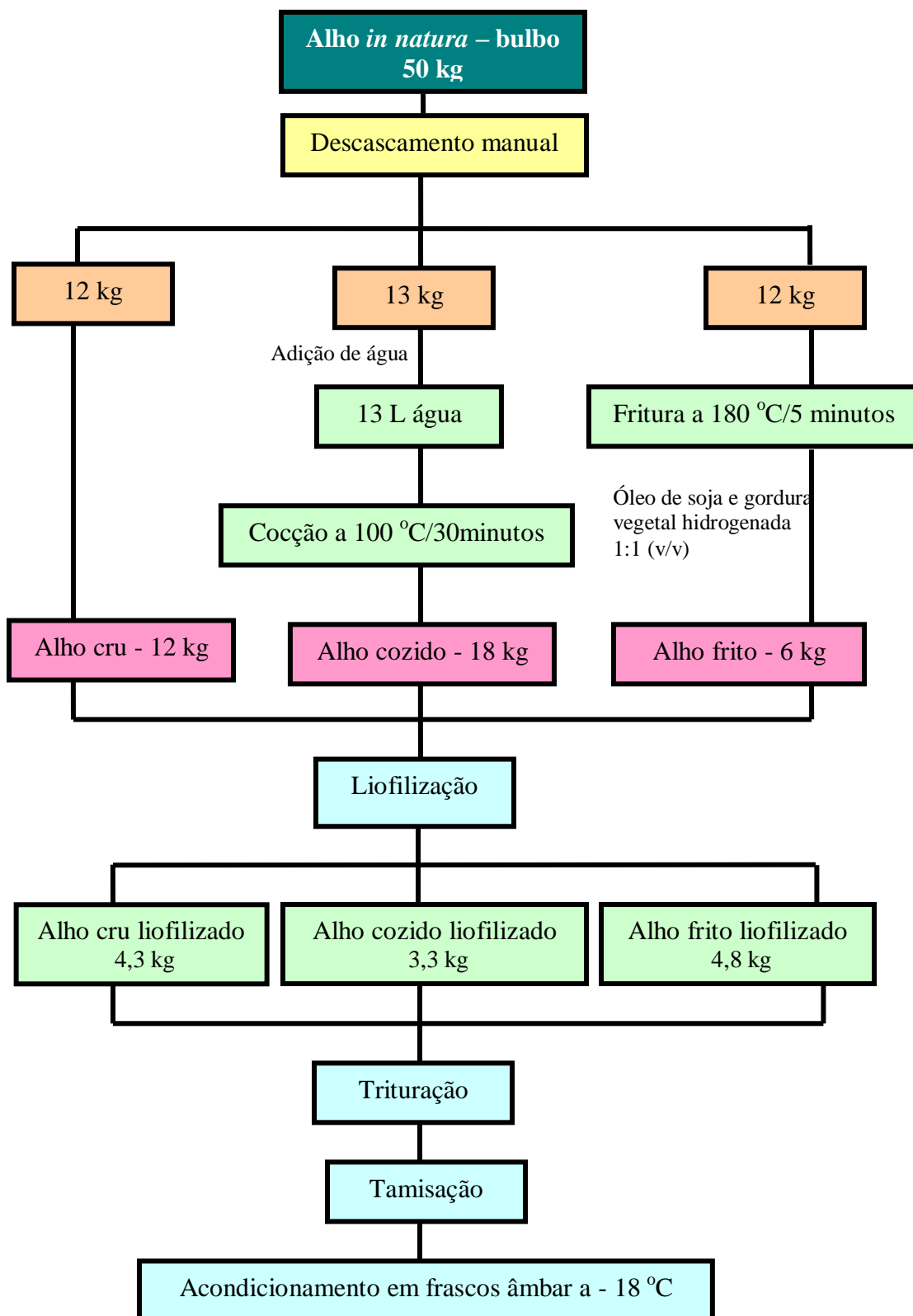
- frita à 180 °C por 5 minutos: foi utilizado óleo de soja e gordura vegetal hidrogenada (1:1 v/v) para a fritura, procedimento padrão da empresa Fresh Garlic Ltda.

Posteriormente as amostras foram liofilizadas. No processo final obteve-se 4,3 kg de alho cru, 3,3 kg de cozido e 4,8 kg de frito. A liofilização foi realizada na empresa Liofoods de Araraquara - SP para se obter uma maior estabilidade do

material. Esta técnica de secagem escolhida consiste em submeter a amostra à uma pressão negativa (vácuo) de 0,1 mm de mercúrio a 60 °C, por um período aproximado de 72 horas. Este procedimento de desidratação é o mais adequado e utilizado quando se trata de amostras a serem analisadas quanto a seu potencial antioxidante (HAMAMA e NAWAR 1991). O material liofilizado foi triturado à temperatura ambiente em moedor.

Para maior homogeneidade no tamanho das partículas, as amostras trituradas foram submetidas à tamisação (ou peneiração), utilizando o tamis 45 mesh/Tyler. As amostras trituradas e tamisadas foram armazenadas a temperatura de - 18 °C, em frascos de vidro âmbar.

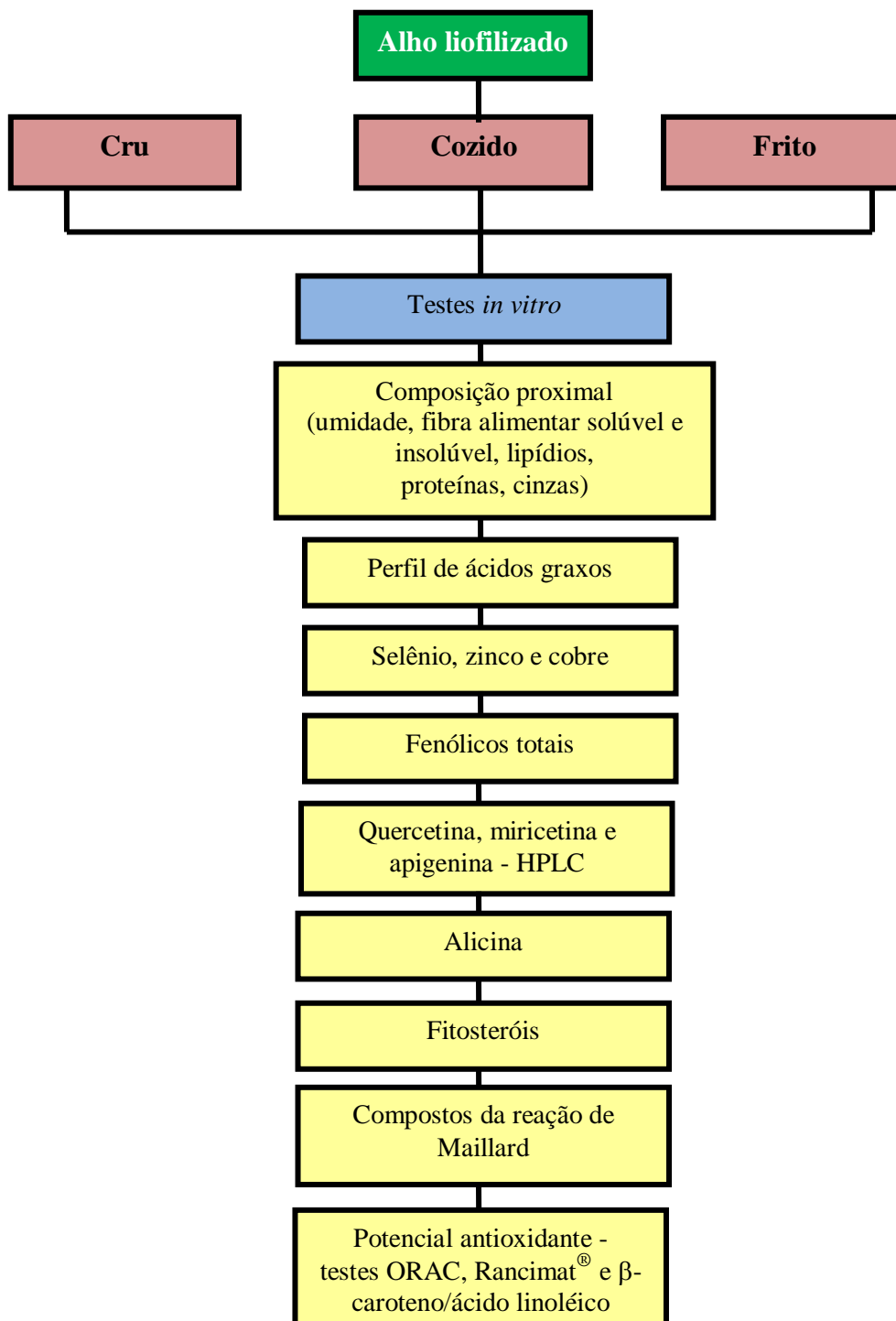
Figura 10 - Esquema do processamento das amostras.



5.3 Protocolo experimental *in vitro*

O protocolo está esquematizado na Figura 11.

Figura 11 - Esquema do protocolo experimental *in vitro*.



5.3.1 Composição proximal

As amostras foram analisadas conforme metodologia da AOAC (1995) para umidade, proteínas e cinzas.

- Umidade: a determinação do grau de umidade foi realizada por processo gravimétrico, o qual se baseia na determinação da perda de peso do alimento submetido a aquecimento em estufa a 105 °C, resultando no resíduo seco ou dessecado.

- Proteínas: foram realizadas pelo método de micro-Kjeldhal, o qual envolve as etapas de digestão, destilação e titulação para a determinação da concentração de nitrogênio da amostra, a partir do qual se calculou o teor de proteína total. Utilizou-se o fator 5,75 para conversão de nitrogênio total em proteína bruta.

- Cinzas (resíduo mineral fixo): resíduo por incineração ou cinzas é o termo que se refere ao resíduo não destruído pela queima do produto. Foram pesados 2 g de cada amostra dessecada em cadinhos calcinados e tarados.

- Os valores de carboidratos foram determinados por diferença (soma das porcentagens de umidade, proteínas, cinzas, fibras e lipídios subtraída de 100).

- Lipídios totais: determinados pelo método de extração de BLIGH e DYER (1959). Após as amostras serem pesadas, adicionou-se clorofórmio, metanol e água. Foram agitadas por 30 minutos e novamente adicionadas clorofórmio e solução de sulfato de sódio 1,5%. Posteriormente, agitou-se por 2 minutos e deixou que as camadas separassem. A camada superior foi descartada (aquosa) e o restante foi filtrado com sulfato de sódio para remover traços de água. Do filtrado, 2 mL foram transferidos para um béquer previamente tarado e depois colocado em estufa a 100 °C.

- Fibras: para as análises de fibras totais, solúveis e insolúveis utilizou-se o método enzimático-gravimétrico (LEE e PROSKY 1992):

a) Em cadinhos de fundo de vidro sinterizado (capacidade 50 mL/porosidade 40-60 mm) foram adicionados, aproximadamente, 1 g de lã de vidro como auxiliar de filtração. Os cadinhos foram deixados 24 horas em solução de detergente neutro a 2%, depois lavados com auxílio de cepilho e enxaguados

com água destilada. Foram secos em estufa a 100 °C e incinerados em mufla a 525 °C por 5 horas, resfriados e lavados com HCl 0,5 N.

b) Um grama de amostra liofilizada (alho cozido, cru ou frito) foi pesado em quadruplicata, sendo que o alho frito foi desengordurado previamente. Adicionou-se 40 mL de solução tampão MES/TRIS, 50 µL de enzima α -amilase, 100 µL de protease, 5 mL de HCl 0,561 N e 100 µL de amiloglicosidase. A partir deste hidrolisado foram determinados os teores de fibra alimentar insolúvel (FAI) e solúvel (FAS).

c) Os resultados de FAI e FAS, expressos em percentagem de matéria seca, foram obtidos após subtração dos valores de cinzas, proteínas (N x 5,75 – determinado por destilação em micro-Kjeldahl) e brancos (resíduo das provas em branco corrigidas para cinzas e proteínas).

5.3.2 Perfil de ácidos graxos

A extração e separação dos lipídios foram realizadas de acordo com BLIGH e DYER (1959). Os ácidos graxos foram determinados por meio da saponificação de alíquotas de extrato lipídico, onde 100 mg de lipídios foram metilados de acordo com o método de METCALFE *et al.* (1966), sendo o trifluoreto de boro-metanol utilizado como agente esterificante.

Para verificar o perfil de ácidos graxos das amostras foi utilizado cromatógrafo a gás. O hidrogênio foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 1,5 mL/min. As temperaturas do injetor e do detector foram de 250 °C e 260 °C, respectivamente. A programação da temperatura da coluna foi de 140 °C inicialmente, com acréscimo de 4°C/minutos, até atingir um platô de 240 °C, permanecendo nesta temperatura por 15 minutos. A razão de divisão *split* para o alho cru e cozido foi de 5, enquanto que para o alho frito foi de 100. Como padrão foi utilizado o Lipid Standard - Fatty acid methyl ester mixture # 189-19. Os resultados foram expressos em % do total de ácidos graxos presentes na amostra.

5.3.3 Selênio, zinco e cobre

Os minerais selênio, cobre e zinco foram quantificados no Instituto de Tecnologia dos Alimentos (ITAL) – Campinas.

Para a quantificação do selênio foi utilizada a metodologia de OLSON *et al.* (1975). Foram pesados 0,5 g da amostra em triplicata em béquer de 150 mL. Quinze mL de ácido nítrico (65% v/v) foram adicionados e aquecidos em chapa à 150 °C por 1 hora. Após resfriamento, adicionou-se 3 mL de peróxido de hidrogênio que foi aquecido gradualmente até 180 °C. Efetuou-se branco analítico. O aquecimento foi mantido, até redução de volume, à aproximadamente 10 mL, que em seguida foi resfriado e transferido para balão de 25 mL e teve seu volume completado com ácido clorídrico 5% (v/v). Efetuou-se quantificação do selênio em espectrômetro de emissão com fonte de plasma com acoplamento indutivo (ICP OES) simultâneo, com visão axial usando nebulizador *sea spray*. A curva analítica para o selênio foi definida, na seguinte faixa de concentração: 0,0025 a 0,100 mg/L e preparada por diluição de um padrão multielementar rastreável. As condições de operação do ICP: potência do plasma 1000 W; vazão argônio principal 5 L/minuto; vazão argônio auxiliar 1,5 L/minuto; vazão de nebulização 0,9 L/minuto; pressão do nebulizador 200 kPa; tempo de leitura 10 segundos; comprimento de onda 196 nm.

Os minerais zinco (Zn) e cobre (Cu) foram quantificados de acordo com o método de HORWITZ (2005). Pesou-se 5 gramas de cada amostra em cápsula de porcelana, em triplicata. Em seguida, aqueceu-se a amostra em chapa elétrica a 300°C e transferiu-se para mufla a 450°C até formação de cinzas brancas. Os elementos minerais cobre e zinco foram determinados após dissolução das cinzas das amostras com 2,5 mL de HCl concentrado e diluição quantitativa em balão volumétrico de 50 mL com água destilada e deionizada.

Para a quantificação foi utilizado espectrômetro de emissão com fonte de plasma acoplado indutivamente (ICP OES). O equipamento utilizado foi um ICP OES, com detecção simultânea, com visão axial. Para a nebulização das soluções foi empregado um nebulizador concêntrico (*sea spray*) acoplado a uma câmara ciclônica. Os parâmetros instrumentais utilizados estão descritos abaixo:

Potência de RF do plasma (kW)	1,0
Gerador de rádio – frequência (MHz)	40
Gás refrigerante (Ar) (L/minuto)	15
Gás auxiliar (Ar) (L/minuto)	1,5
Pressão do nebulizador (KPa)	200
Tempo de estabilização (s)	10
Tempo de leitura (s)	10
Correção de fundo	3 pontos
Elementos (comprimento de onda / nm)	Cu (324,75) e Zn (206,20)

A curva analítica para a quantificação dos elementos minerais foi preparada pela diluição de solução-padrão a 1000 mg/L em solução de ácido clorídrico 5% (v/v) nas seguintes faixas de concentrações: Cu 0,010 a 2,500 mg/L e Zn 0,100 a 5,000 mg/L.

5.3.4 Obtenção dos extratos

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, no presente estudo foram utilizadas 3 metodologias e 4 solventes diferentes para a obtenção dos extratos de alho e, posteriormente, para verificar quais seriam a melhor extração e o melhor solvente quanto à atividade antioxidante e ao teor de fenólicos totais.

A primeira metodologia testada foi descrita por NUUTILA *et al.* (2003) com modificações, onde foi realizada extração com 3 diferentes solventes, etanol, água destilada e metanol/água (70:30 v/v) (Figura 12). Foram pesados 3 g de amostra e adicionados 20 mL de etanol ou água destilada ou metanol/água (70:30 v/v). A amostra foi agitada (temperatura ambiente) por 1 hora em agitador magnético e ultrassonificada por 20 minutos, centrifugada por 20 minutos a 936 x g e 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 solvente para lavagem final do resíduo, sendo este descartado. Os sobrenadantes foram completados para o volume de 50 mL com os respectivos solventes (etanol ou água destilada ou metanol/água - 70:30 v/v).

A segunda foi de acordo com GORINSTEIN *et al.* (2006b) com modificações (Figura 13). Foram pesados 3 g de amostra e adicionados 20 mL de etanol ou água destilada ou metanol/água (70:30 v/v), a amostra foi agitada por 6 horas a 4°C em agitador magnético, centrifugada por 10 minutos a 2570 x g e em seguida filtrada. 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 solvente para lavagem final do resíduo, sendo este descartado. Os sobrenadantes foram completados para o volume de 50 mL com os respectivos solventes (etanol ou água destilada ou metanol/água - 70:30 v/v).

A terceira metodologia também foi descrita por GORINSTEIN *et al.* (2006b), na qual se obteve extratos altamente lipofílicos (Figura 14). Foi pesado 1 g de amostra e adicionados 50 mL de acetona/água (75:25 v/v), a amostra foi agitada (temperatura ambiente) por 2 horas em agitador magnético e depois filtrada. O resíduo retido no filtro sofreu nova extração e os sobrenadantes foram transferidos para um funil de decantação. Foi adicionado 150 mL de éter dietílico. A fase superior contendo os compostos lipofílicos foi lavada várias vezes com água, e em seguida filtrada com sulfato de sódio. O filtrado foi evaporado em rotaevaporador e posteriormente suspenso em 25 mL de acetona.

Todos os extratos, aquoso, etanólico, metanol/água e acetona, obtidos das 3 metodologias foram colocados em frascos âmbar, sob atmosfera de nitrogênio e armazenados no freezer à -18 °C até o momento das análises.

Figura 12 - Esquema da extração das diferentes amostras de alho, segundo NUUTILA *et al.* (2003), com modificações.

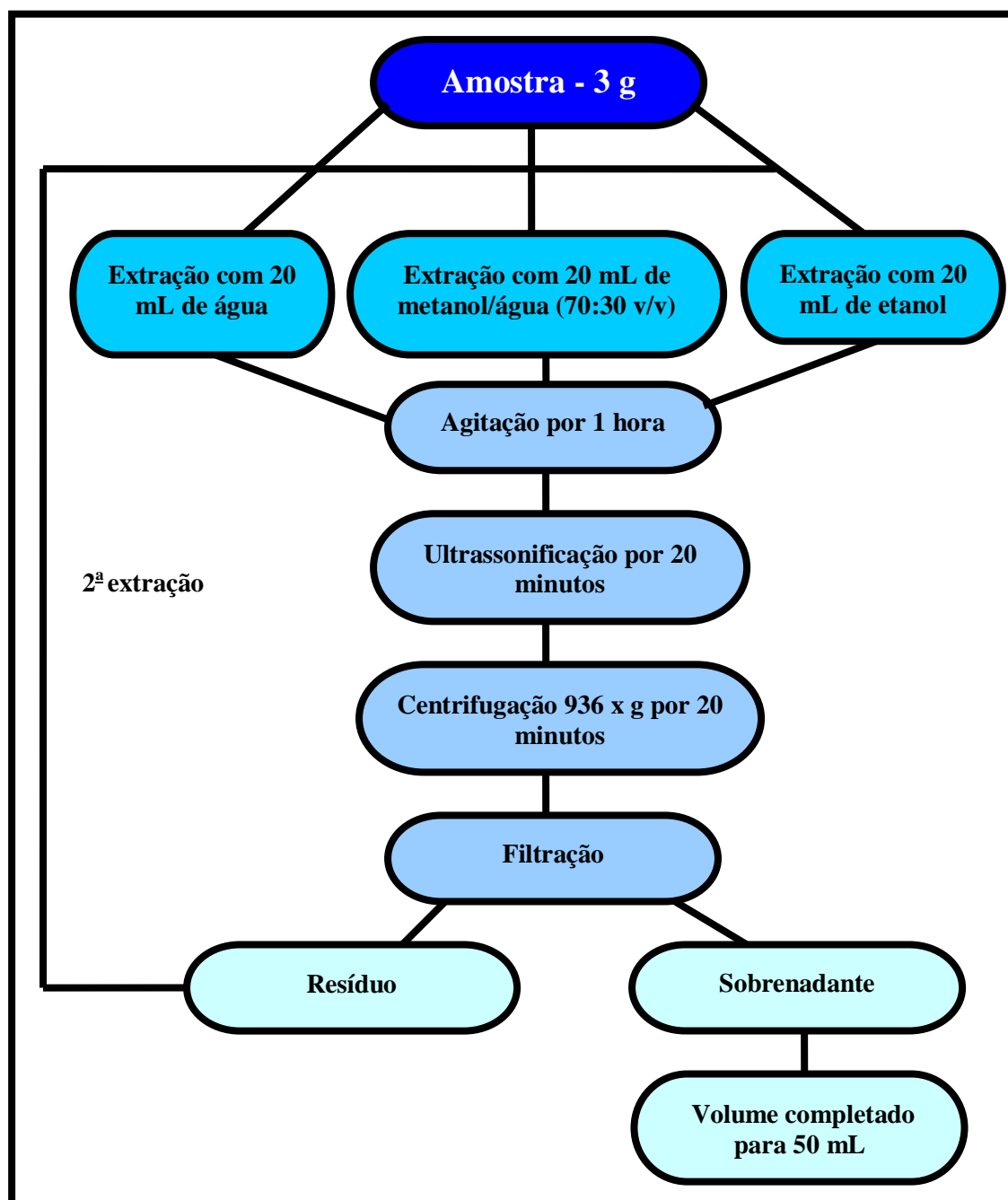


Figura 13 - Esquema da extração das diferentes amostras de alho, segundo GORISNTEIN *et al.* (2006b), com modificações.

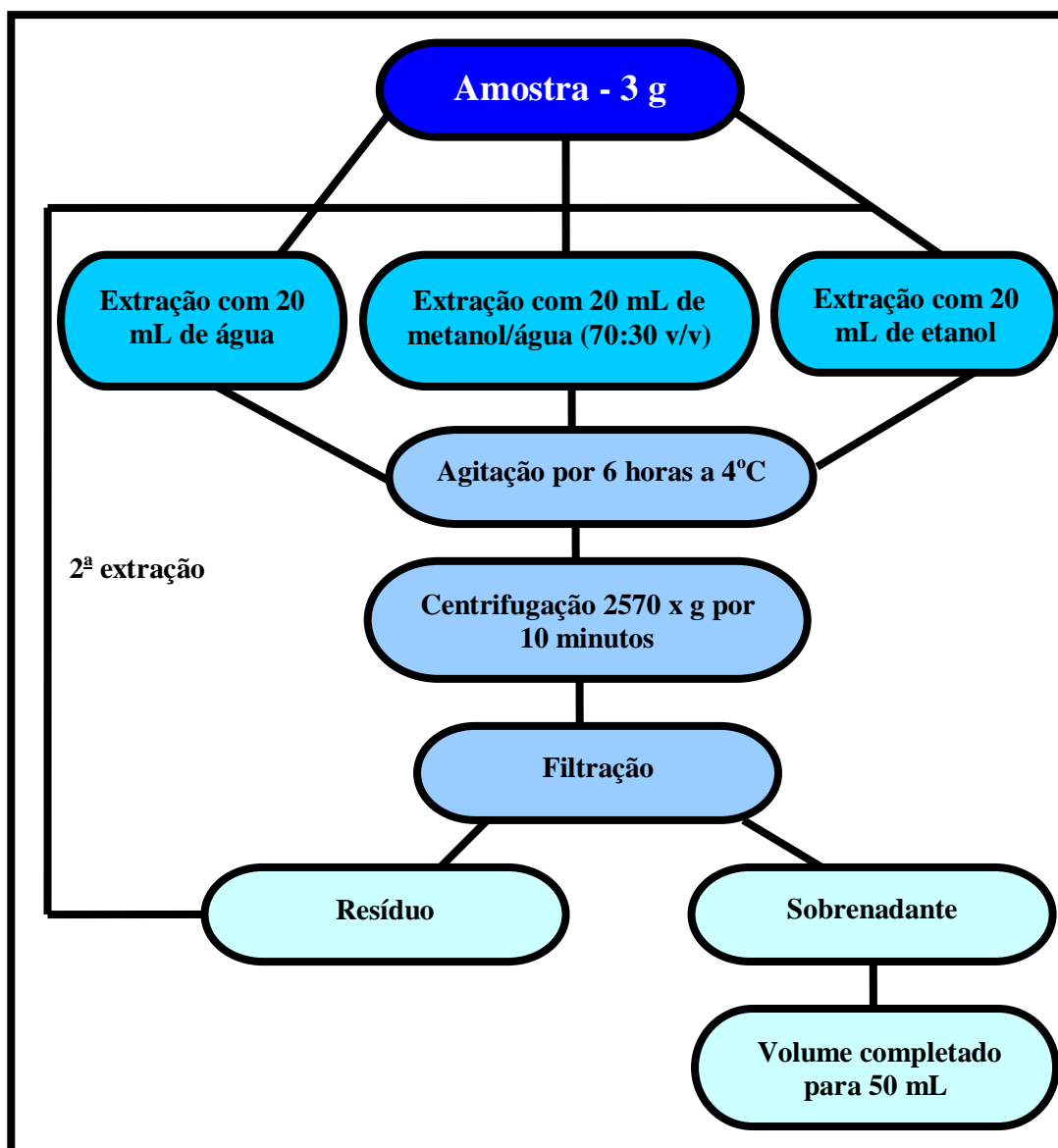
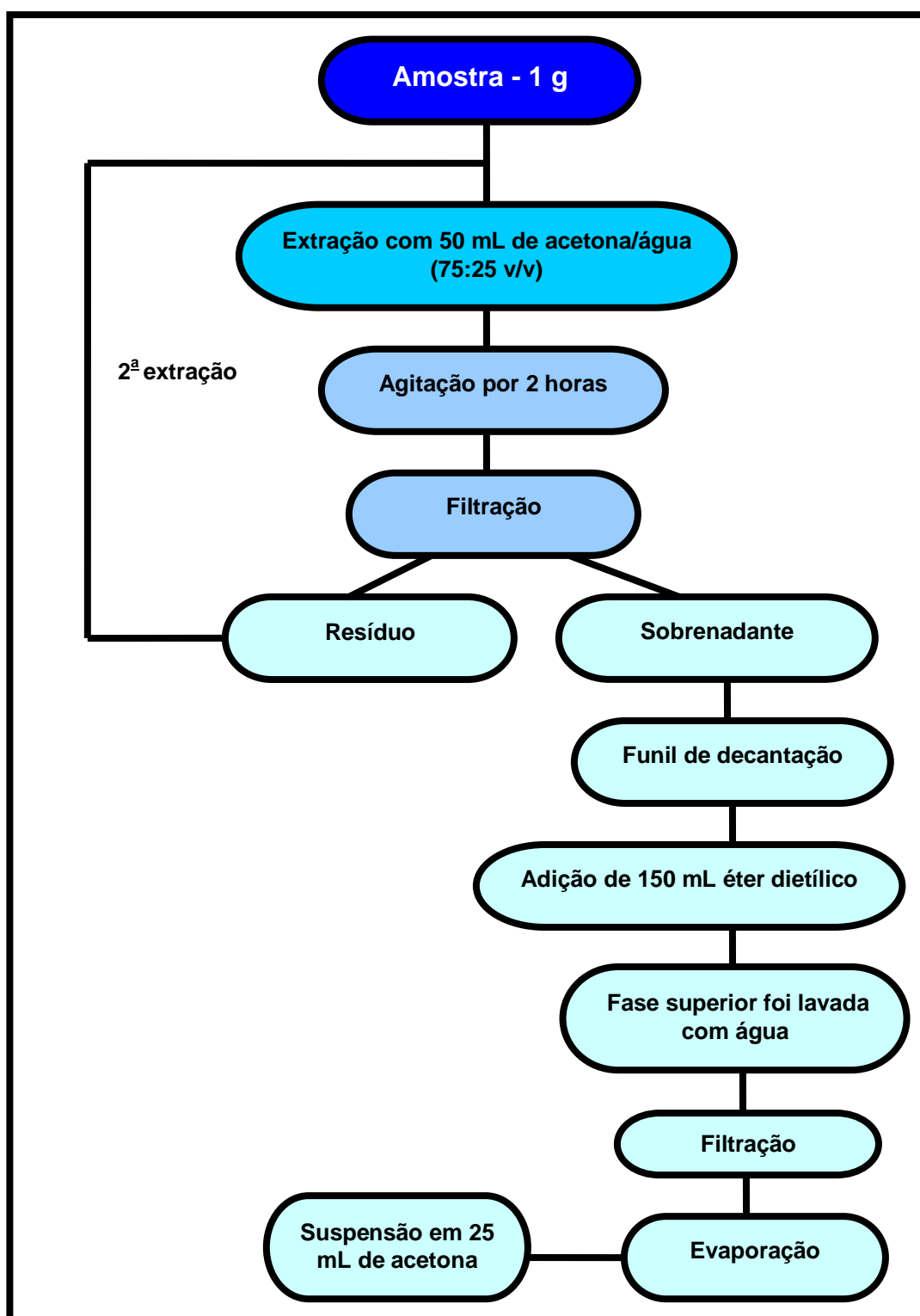


Figura 14 - Esquema da extração de compostos lipofílicos das diferentes amostras de alho, segundo GORISNTEIN *et al.* (2006b).



5.3.5 Determinação dos sólidos solúveis dos extratos

A quantificação dos sólidos solúveis dos extratos 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).

5.3.6 Compostos bioativos

5.3.6.1 Determinação do compostos fenólicos totais

A obtenção do teor de compostos fenólicos presentes nas diferentes amostras 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 800 µL da solução de carbonato de sódio (20% m/v). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 3 minutos a 20000 x g 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. 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:

$$y = 9,8695x + 0,0151 \quad (R^2 = 0,9943)$$

onde: y = valor da absorvância

x = teor de fenólicos totais

R^2 = coeficiente de determinação do modelo

Os resultados obtidos foram expressos em mg equivalentes de ácido gálico por 100 g de amostra em base seca (mg EAG/100g).

5.3.6.2 Quercetina, miricetina e apigenina por HPLC

A quantificação do teor dos flavonóides quercetina, miricetina e apigenina foi realizada de acordo com a metodologia de HERTOOG *et al.* (1992). As amostras (0,5 g) foram hidrolisadas com 40 mL da solução metanol/água (62,5:37,5), 2 mg/mL de TBHQ (tert-butilidroquinona) e 10 mL de HCl 6 M a 90 °C com refluxo por 2 horas. Após a hidrólise, completou-se o volume para 100 mL de metanol. As amostras foram ultrasonificadas por 5 minutos e injetadas em cromatógrafo líquido (HPLC). A coluna utilizada foi a C18 (3,9 x 150 mm; 4 µm particle) da Varian. A fase móvel era constituída de solução 1:1 metanol/água (pH 2,5), com fluxo de 1,3 mL/minuto. Foram injetados 20 µL da amostra. A leitura da absorvância foi mensurada em comprimento de onda de 370 nm. O cálculo dos teores de quercetina, miricetina e apigenina foi realizado com elaboração de curva padrão destes três compostos.

Para a validação do método foram realizados os seguintes parâmetros: linearidade, recuperação, limite de detecção e limite de quantificação (Tabelas 3 e 4).

O coeficiente de correlação da curva de regressão linear foi utilizado como parâmetro para se verificar a linearidade.

Tabela 3 - Correlação linear dos fenólicos quercetina, miricetna e apigenina.

Padrões	Concentração (µg)	Coefficiente de correlação
Quercetina	0,05 – 0,3	0,9934
Miricetina	0,05 – 0,3	0,9970
Apigenina	0,05 – 0,3	0,9951

Os limites de detecção e de quantificação estão relacionados à metodologia empregada, e também às condições do próprio aparelho.

Tabela 4 - Limites de detecção e quantificação do método e recuperação dos fenólicos quercetina, miricetina e apigenina.

Padrões	Limites de detecção (µg/mL)	Limites de Quantificação (µg/mL)	Recuperação (%)
Quercetina	0,21	0,44	98,06
Miricetina	0,12	0,39	99,34
Apigenina	0,19	0,63	99,08

5.3.6.3 Alicina

A alicina pode ser estimada pela mensuração da atividade enzimática que determina a concentração de ácido pirúvico. Este método é baseado na reação da alliina-allinase a qual produz duas moléculas de ácido pirúvico e uma molécula de alicina.

Para obtenção dos extratos, 1 g de alho liofilizado foi extraído com 20 mL de água a 25 °C por 10 minutos em agitador magnético. Em seguida a amostra foi deixada em repouso por 15 minutos e filtrada, utilizando papel filtro (marca Nalgon, diâmetro 12,5 cm e porosidade 3 micra) (LAGUNAS e CASTAIGNE 2008). Posteriormente a alicina nas amostras de alho foi determinada segundo o proposto por SCHWIMMER e WESTON (1961), onde foi colocado em tubos de ensaio 1 mL do extrato, 1 mL de 0,0125% de 2,4-dinitrofenilidrazina (DNPH) em HCl (2 N), 1 mL de água destilada e agitados. Os tubos de ensaio foram colocados em banho-

maria a 37 °C durante 10 minutos. Foram adicionados 5 mL de NaOH 0,6 N, agitados e deixados por 5 minutos para desenvolver a cor amarela. As absorvâncias foram lidas em espectrofotômetro a 420 nm. O ácido pirúvico (AP) foi utilizado como padrão. Os resultados foram expressos em micromoles de ácido pirúvico por grama de alho em base seca ($\mu\text{mol AP/g}$).

5.3.6.4 Fitosteróis

Para obtenção da fração de fitosteróis foi utilizado o método de saponificação preconizado por SALDANHA *et al.* (2006) com adição de 4 mL de uma solução aquosa de KOH 50% e 6 mL de álcool etílico em amostras previamente pesadas. As amostras permaneceram sob agitação a temperatura ambiente, na ausência de luz, durante 22 horas. Após esse período, adicionou-se em cada frasco 5 mL de água destilada e 10 mL de hexano. Em seguida, os frascos foram agitados em vortex durante 30 segundos. A fração superior (insaponificável contendo os fitosteróis) foi recolhida com o auxílio de pipetador automático e em seguida transferida para balão de fundo redondo. O procedimento foi repetido três vezes, perfazendo 4 extrações ou 40 mL da fase hexânica.

A derivatização foi de acordo com JOHNSON e DUTTA (2003) com modificações. Os testes preliminares utilizando o procedimento deste autor demonstraram que o emprego de temperaturas elevadas levou a degradação dos compostos avaliados, com duplicação de picos e perda da resolução cromatográfica. Desta forma, tornou-se necessária a aplicação de uma metodologia sem a utilização do calor como catalizador, sendo a reação inicial otimizada através dos seguintes parâmetros:

a) A reação foi realizada com a adição de 0,2 mL de Tri-Sil a temperatura ambiente e na ausência de luz. Sem a presença do calor como catalizador, o tempo da reação foi alterado de 45 minutos para 2 horas, sendo o mesmo ajustado de acordo com metodologia de saponificação a frio proposta por SALDANHA *et al.* (2006).

b) Transcorridas as 2 horas da reação com o Tri-Sil e evaporação do mesmo sob N₂ (nitrogênio), outra modificação efetuada foi a adição de 1 mL de hexano em detrimento aos 100 µL propostos por JOHNSON e DUTTA (2003).

c) Após a centrifugação, observou-se a presença de resíduos de piridina na camada hexânica ou sobrenadante, podendo a mesma interagir com as colunas cromatográficas, reduzindo a vida útil das mesmas. Para resolver a questão, outra modificação foi efetuada: a etapa de centrifugação foi substituída, sendo os frascos agitados com velocidade máxima, durante 30 segundos e o sobrenadante filtrados através de filtros Millex (Millipore, 0.45 µm) para remoção do resíduo em questão. Após essa etapa, os extratos apresentaram-se translúcidos, sendo posteriormente secos sob N₂ e diluídos no momento da injeção.

Inicialmente, foram realizados testes cromatográficos utilizando os padrões de referência dos fitosteróis principais: Campesterol, Stigmasterol e β-sitosterol com o intuito de adequar a separação dos mesmos através do emprego de coluna capilar (Factor Four, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, Varian, USA).

As análises cromatográficas foram realizadas em Cromatógrafo a Gás, com detector de ionização em chama. As condições cromatográficas empregadas foram determinadas durante o experimento em questão:

Injeção em modo split, razão de divisão 1:20;

Temperatura do injetor 290 °C;

Temperatura do detector 350 °C;

Condições das colunas: temperatura inicial 230 °C $\xrightarrow{2^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 264 °C (5 minutos)
 $\xrightarrow{1^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 275 °C (2 minutos).

Tempo total da corrida 35 minutos.

5.3.7 Análise de compostos intermediários fluorescentes da reação de Maillard

A análise de compostos intermediários fluorescentes foi realizada segundo DELGADO-ANDRADE *et al.* 2006. Primeiramente 500 mg de amostra foi suspendida em 5 mL de água deionizada em um tubo de centrífuga de 15 mL. O tubo foi agitado vigorosamente por 1 minuto e clarificado com 0,25 mL de cada uma das

soluções de Carrez I e II e centrifugado a 4500 x g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e transferido para um balão volumétrico de 10 mL e duas novas extrações foram feitas com 2 mL de água deionizada. Os sobrenadantes foram combinados e o volume completado por 10 mL com água deionizada. A solução foi filtrada em filtro de 0,45 µm e diluída na proporção 1:6. A linearidade da resposta fluorescente foi verificada com uma solução de sulfato de quinina de 1 µg/mL dissolvida em 0,1 mol/L H₂SO₄. A solução final foi medida nos comprimentos de onda de 347 nm de excitação e 415 nm de emissão e os resultados foram expressos em Intensidade de Fluorescência por mg de amostra em base seca, utilizando espectrofotômetro de fluorescência com cubetas de quartzo com caminho óptico de 1cm.

5.3.8 Avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

5.3.8.1 Teste ORAC (“Oxygen radical absorbance capacity”)

Este teste avalia a capacidade antioxidante da amostra, medindo sua capacidade de proteger a fluoresceína (FL) da oxidação pelo AAPH (dihidrocloreto de 2,2'-azobis (2-aminopropanol)) no meio reacional, segundo metodologia descrita por CAO *et al.* 1993 e modificada por OU *et al.* 2001 . O branco da análise foi preparado misturando-se 3 mL de tampão, 15 µL de FL e 300 µL de AAPH e, pela medida da fluorescência (excitação = 494 nm, emissão = 515 nm), é calculada a área sob a curva de absorbância versus o tempo. Para a avaliação da amostra, é preparada uma solução com 2,7 mL de tampão fosfato, 300 µL de amostra convenientemente diluída, 15 µL de FL e 300 µL de AAPH, repetindo-se a medição feita para o branco. A temperatura de incubação da reação é de 37 °C. O resultado é comparado com a área sob a curva de um padrão preparada com 2,7 mL de tampão, 300 µL de Trolox, 15 µL de FL e 300 µL de AAPH. A reação com os radicais livres consome a FL e a fluorescência decai.

5.3.8.2 Sistema β -caroteno/ácido linoléico

A determinação da atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico foi realizada de acordo com a metodologia descrita por MARCO (1968) e modificada por MILLER (1971). Como substrato, foi utilizada a emulsão de β -caroteno/ácido linoléico. Em 28 μ L da solução de β -caroteno (preparada na proporção de 20 mg de β -caroteno/mL de clorofórmio) foram adicionados 28 μ L de ácido linoléico e 200 mg de Tween 40 (emulsificante). Em seguida, o clorofórmio foi evaporado sob atmosfera de nitrogênio e acrescentados 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. 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 registradas a cada 30 minutos, até atingir o tempo total de 2 horas. A oxidação do β -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:

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

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:

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

5.3.8.3 Avaliação da capacidade protetora da oxidação lipídica utilizando o aparelho Rancimat®

Para avaliar a capacidade protetora utilizou-se o aparelho Rancimat® 743, onde foi medido o período de indução da gordura vegetal hidrogenada contendo o extrato (ANTOLOVICH 2002). Um mL 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 $110\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\Delta T = 1,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, 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. 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.

5.3.9 Análise dos Dados

Os resultados das diferentes análises foram apresentados como média e desvio padrão e para compará-los foi realizada análise de variância (NETER *et al.* 1996) e o teste de Tukey para as comparações múltiplas. Todas as análises foram realizadas em triplicata, com exceção às fibras alimentares (quadruplicata). 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 16.0 for Windows.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Composição centesimal

Para as medidas de umidade dos alhos cru e cozido liofilizados, descritas na Tabela 5, pode-se constatar pela análise de variância que não existe diferença estatisticamente significativa ($p = 0,368$). Já para o alho frito este apresentou menor teor de umidade (4,78%).

A umidade do alho cru íntegro (sem liofilizar) foi de 68,5%. Este valor é próximo ao encontrado na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO (2006).

O teor de cinzas, proteínas e carboidratos foi menor para o alho frito. Não houve diferença estatística ($p > 0,05$) destes nutrientes para os alhos cru e cozido. Em relação ao teor de lipídios no alho frito, pode-se observar que os valores aumentaram cerca de 25 vezes em relação aos alhos cru e cozido.

Pelos resultados da TACO (2006) o alho cru contém 4,0%, 21,54%, 0,62%, 13,2% e 73,5% de cinzas, proteínas, lipídios, fibras e carboidratos, respectivamente (resultados em base seca). De um modo geral, estes resultados estão próximos aos encontrados em nosso estudo.

O teor de fibras totais para o alho cru foi de 10,04%, sendo que 71,61% é solúvel e 28,39% é insolúvel, resultados condizentes com o estudo de LEE *et al.* (2008), no qual verificaram que 73% das fibras presentes no alho cru são solúveis.

Os efeitos das fibras solúveis na diminuição do colesterol estão relacionados com suas propriedades de formação de gel (ANDERSON 1995a; CHEN *et al.* 2008; ANDERSON *et al.* 2009), a diminuição da absorção de ácidos biliares e a ação dos ácidos graxos de cadeia curta produzidos na fermentação sobre a função hepática (ANDERSON 1995b). Além disso, verifica-se que as fibras podem também atuar

sobre fatores de risco para doenças coronarianas como hipertensão, além da obesidade e diabetes (MANSON *et al.* 1995; ANDERSON 1995a, GRAHAM *et al.* 2007; ANDERSON *et al.* 2009; SOLÁ *et al.* 2010).

Tabela 5 - Composição centesimal (média \pm desvio padrão) em base seca dos alhos cru, cozido e frito liofilizados.

Componente	Alho cru (%)	Alho cozido (%)	Alho frito (%)
Umidade	6,47 \pm 0,09 ^b	6,59 \pm 0,12 ^b	4,78 \pm 0,08 ^a
Cinzas	4,21 \pm 0,07 ^b	4,15 \pm 0,08 ^b	2,99 \pm 0,08 ^a
Proteínas	18,54 \pm 0,19 ^b	18,53 \pm 0,64 ^b	13,88 \pm 1,20 ^a
Lipídios	0,66 \pm 0,00 ^b	0,63 \pm 0,00 ^b	17,88 \pm 0,31 ^c
Fibras Totais	10,04 \pm 0,74 ^a	10,33 \pm 0,30 ^a	12,74 \pm 0,60 ^b
Fibras solúveis	7,19 \pm 0,57 ^a	7,99 \pm 0,26 ^a	9,04 \pm 0,63 ^b
Fibras insolúveis	2,85 \pm 0,40 ^a	2,34 \pm 0,12 ^a	3,71 \pm 0,25 ^b
Carboidratos*	60,08 \pm 0,86 ^b	59,77 \pm 0,44 ^b	47,73 \pm 0,93 ^a

* Calculado por diferença (NIFEXT).

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

6.2 Perfil de ácidos graxos

O perfil lipídico foi determinado nas amostras de alho porque este influencia na redução ou no incremento do colesterol plasmático. Nas amostras de alho cru e cozido os ácidos graxos encontrados em maior abundância foram o linoléico (insaturado) e palmítico (saturado), conforme apresentado na Tabela 6. Já no alho frito, além do linoléico e palmítico, foram encontrados em grandes quantidades o elaídico (*trans*) e o oléico (insaturado). O alto conteúdo de ácidos graxos *trans* no alho frito (14,85%) é devido ao processo de fritura com 50% de gordura vegetal hidrogenada. Sabe-se que os *trans* podem aumentar colesterol total e não-HDL (ASCHERIO 2006).

Os cromatogramas referentes à análise de ácidos graxos no padrão e nas amostras de alho encontram-se no Anexo 4.

O perfil lipídico do alho cru foi semelhante com a Tabela de composição química dos alimentos, United States Department of Agriculture (USDA). Os alhos cru e cozido possuem um alto teor de ácidos graxos poliinsaturados.

Tabela 6 - Média \pm desvio padrão do perfil de ácidos graxos (g/100 g do total de ácidos graxos) dos alhos cru, cozido e frito liofilizados.

Ácido graxo	Alho cru	Alho cozido	Alho frito
C16:0 (Palmítico)	18,73 \pm 0,01 ^b	19,35 \pm 0,02 ^c	12,40 \pm 0,13 ^a
C18:0 (Esteárico)	0,00 ^a	0,00 ^a	7,77 \pm 0,09 ^b
C18:1 n9-t (Elaídico)	0,00 ^a	0,00 ^a	14,85 \pm 0,01 ^b
C18:1 (oléico)	7,04 \pm 0,02 ^a	7,12 \pm 0,01 ^a	28,26 \pm 0,64 ^b
C:18:2 (Linoléico)	68,82 \pm 0,03 ^b	68,69 \pm 0,32 ^b	34,04 \pm 0,46 ^a
C20:1 (Eicosenoico)	5,41 \pm 0,01 ^c	4,84 \pm 0,01 ^b	2,68 \pm 0,14 ^a
Total saturados	18,73	19,35	20,17
Total monoinsaturados	12,45	11,96	45,79
sendo <i>Trans</i>	0,00	0,00	14,85
Total poliinsaturados	68,82	68,69	34,04

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

6.3 Minerais

Os minerais selênio, cobre e zinco são nutrientes importantes que são encontrados no alho. O conteúdo de selênio presente no alho aumenta significativamente a habilidade deste em prevenir câncer, aterosclerose e doença isquêmica coronariana (BARABOI e SHESTAKOVA 2004). Os principais selenocompostos presentes no alho são Se-metilselenocisteína e gama-glutamilselenocisteína (OGRA e SUZUKI 2005; GORINSTEIN *et al.* 2006b). O selênio e o cobre fazem parte de algumas enzimas antioxidantes, como a glutathione peroxidase (OU *et al.* 2003).

Os resultados dos minerais das amostras de alho estão apresentados na Tabela 7.

Os valores de minerais de alhos analisados ao redor do mundo apresentam grandes variações. Segundo a Tabela de composição química dos alimentos, United States Department of Agriculture (USDA), os teores de cobre, zinco e selênio do alho cru (em base seca) são 6,77 mg/kg, 26,19 mg/kg e 0,32 mg/kg, respectivamente. Comparando com o presente estudo, o teor de cobre e zinco é semelhante, porém o teor de selênio é superior. Já o alho de origem Asiática apresenta 1,74 mg de selênio por kg de alho, semelhante a este estudo (FAO 2008).

Segundo o artigo de GORISNTEIN *et al.* (2006b), o conteúdo de cobre do alho cru e do cozido foi de 1,43 e 1,44 mg/kg, respectivamente. Já o conteúdo de selênio foi 0,55 e 0,54 mg/kg, respectivamente.

Com a fritura houve diminuição dos três minerais quando comparado com a amostra crua.

Tabela 7 - Minerais (média \pm desvio padrão) em base seca dos alhos cru, cozido e frito liofilizados.

Componente	Alho cru (mg/kg)	Alho cozido (mg/kg)	Alho frito (mg/kg)
Selênio	1,53 \pm 0,02 ^{a,b}	1,78 \pm 0,09 ^b	1,28 \pm 0,17 ^a
Cobre	6,25 \pm 0,09 ^a	6,73 \pm 0,07 ^a	4,70 \pm 0,02 ^b
Zinco	28,14 \pm 0,30 ^b	30,29 \pm 0,32 ^c	22,25 \pm 0,11 ^a

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

6.4 Compostos bioativos

6.4.1 Sólidos solúveis e 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 (quercetina, miricetina e apigenina) (BILYK e SAPERS 1985; MIEAN e MOHAMED 2001; NUUTILA *et al.* 2003; LANZOTTI 2006). Sabe-se que os compostos fenólicos constituem um dos maiores grupos de compostos

presentes em plantas, atuando como antioxidantes primários ou seqüestradores de radicais livres (SINEIRO *et al.* 1989; SHAHIDI *et al.* 1992). Desta forma, foi determinado o teor de fenólicos totais das amostras estudadas.

Como se verifica na Figura 15, o teor de compostos fenólicos nas amostras de alho variou de 4,19 a 187,68 mg EAG/100g, em base seca, isso dependendo do tipo de solvente e do método de extração utilizados. Os maiores valores de fenólicos foram observados para os extratos aquosos do alho cru, pelo método de extração 1 (2 horas de extração) e para o método 2 (6 horas de extração).

Com o processamento o teor de fenólicos (método 1 e 2) nos extratos aquosos, etanólicos e com acetona diminuiu, o contrário foi observado para o extrato a base da mistura de metanol/água (Figura 15). LANZOTTI (2006) em seu artigo de revisão verificou que o teor de quercetina diminuiu com a fritura, assim como no estudo de GORINSTEIN *et al.* (2010) os compostos fenólicos totais diminuíram em 18% com a fritura do alho.

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).

NUUTILA *et al.* (2003) estudando o extrato metanólico do alho cru liofilizado, verificaram que este contém 11,5 mg EAG/100 g de compostos fenólicos e a casca 70,5 mg EAG/100 g. Já GORINSTEIN *et al.* (2009) encontraram 900, 636 e 265 mg EAG/100g destes compostos nos extratos metanólico, metanol/água (1:1 v/v) e acetona, respectivamente.

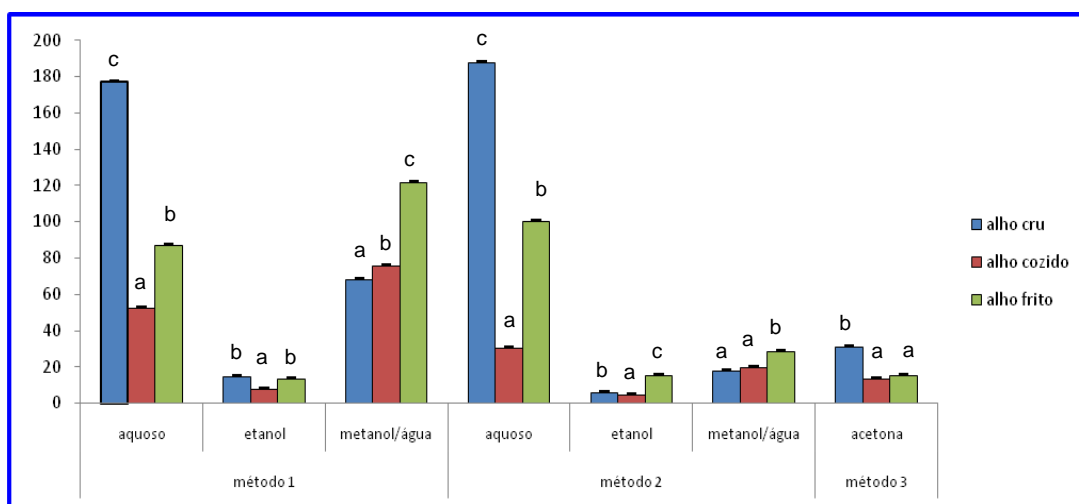
Os nossos resultados de fenólicos totais por 100 g de alho variaram com o tipo de solvente e o método utilizado para extração. Para o extrato metanol/água, o alho cru apresentou em média 68,07 e 17,55 mg EAG/100 g para o método 1 e para o método 2 de extração, respectivamente, valores estes maiores que o achado por NUUTILA, porém menores do que o estudo de GORINSTEIN (2009).

Já KAUR e KAPOOR (2002), determinaram os compostos fenólicos de diferentes vegetais, inclusive o do alho cru. Os resultados demonstraram que o alho possui um teor médio de fenólicos totais de 145 mg catecol/100 g do produto.

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.

Figura 15 - Teor de fenólicos totais (mg EAG/100g), em base seca, dos diferentes processamentos do alho.



Método 1 = Nuutila *et al.* (2003) com modificações; Método 2 = Gorinstein *et al.* (2006b) com modificações; Método 3 = Gorinstein *et al.* (2006b).

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

Em geral, a água foi o solvente que melhor extraiu compostos do alho quando comparados com os demais solventes (etanol, acetona, metanol/água) (Tabela 8, 9 e 10). Assim como no estudo de GORINSTEIN *et al.* (2009) a acetona foi o solvente menos eficaz na extração dos compostos fenólicos desta especiaria.

Tabela 8 - Sólidos solúveis e teor de fenólicos totais (média \pm desvio padrão), em base seca, dos extratos de alho cru liofilizado.

Método	Solvente	Sólidos solúveis (mg/mL)	Teor de fenólicos totais (mg EAG/100g)
1	aquoso	34,30 \pm 0,25 ^d	177,00 \pm 13,49 ^d
	etanol	0,30 \pm 0,10 ^a	14,52 \pm 0,76 ^{a,b}
	metanol/água (70:30 v/v)	30,90 \pm 0,36 ^c	68,07 \pm 1,80 ^c
2	aquoso	30,17 \pm 0,06 ^c	187,68 \pm 14,79 ^d
	etanol	0,47 \pm 0,06 ^a	5,69 \pm 0,45 ^a
	metanol/água (70:30 v/v)	28,43 \pm 0,68 ^b	17,55 \pm 1,63 ^{a,b}
3	acetona	0,40 \pm 0,10 ^a	30,70 \pm 2,70 ^b

1 = Nuutila *et al.* (2003) com modificações; 2 = Gorinstein *et al.* (2006b) com modificações; 3 = Gorinstein *et al.* (2006b).

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

Tabela 9 - Sólidos solúveis e teor de fenólicos totais (média \pm desvio padrão), em base seca, dos extratos de alho cozido liofilizado.

Método	Solvente	Sólidos solúveis (mg/mL)	Teor de fenólicos totais (mg EAG/100g)
1	aquoso	23,90 \pm 0,10 ^b	52,29 \pm 0,42 ^f
	etanol	0,50 \pm 0,00 ^a	7,89 \pm 0,18 ^b
	metanol/água (70:30 v/v)	34,00 \pm 0,10 ^d	75,37 \pm 2,82 ^g
2	aquoso	35,97 \pm 0,21 ^c	30,48 \pm 0,99 ^c
	etanol	0,83 \pm 0,15 ^a	4,19 \pm 0,10 ^a
	metanol/água (70:30 v/v)	29,07 \pm 0,45 ^c	19,55 \pm 1,09 ^d
3	acetona	0,50 \pm 0,10 ^a	13,44 \pm 0,54 ^c

1 = Nuutila *et al.* (2003) com modificações; 2 = Gorinstein *et al.* (2006b) com modificações; 3 = Gorinstein *et al.* (2006b).

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

Tabela 10 - Sólidos solúveis e teor de fenólicos totais (média \pm desvio padrão), em base seca, dos extratos de alho frito liofilizado.

Método	Solvente	Sólidos solúveis (mg/mL)	Teor de fenólicos totais (mg EAG/100g)
1	aquoso	22,03 \pm 0,12 ^c	86,95 \pm 1,64 ^c
	etanol	11,60 \pm 0,17 ^b	13,33 \pm 1,07 ^a
	metanol/água (70:30 v/v)	26,07 \pm 0,06 ^c	121,82 \pm 3,11 ^e
2	aquoso	21,57 \pm 0,80 ^c	100,41 \pm 2,65 ^d
	etanol	11,60 \pm 0,46 ^b	14,94 \pm 0,62 ^a
	metanol/água (70:30 v/v)	23,23 \pm 0,29 ^d	28,28 \pm 0,80 ^b
3	acetona	4,80 \pm 0,20 ^a	15,13 \pm 0,61 ^a

1 = Nuutila *et al.* (2003) com modificações; 2 = Gorinstein *et al.* (2006b) com modificações; 3 = Gorinstein *et al.* (2006b).

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

6.4.2 Quercetina, miricetina e apigenina por HPLC

Os teores de quercetina, miricetina e apigenina, expressos em mg/100 g de alho em base seca, encontram-se na Tabela 11.

No presente estudo foi possível detectar apenas quercetina nas amostras. No estudo de NUUTILA *et al.* (2003) não foi detectado os compostos fenólicos quercetina e apigenina em amostras de alho. Já MIEAN e MOHAMED (2001) verificaram que o alho apresenta 47 mg/kg de quercetina, 217 mg/kg de apigenina e 693 mg/kg de miricetina.

Com o processo de fritura pode-se observar que o teor de quercetina diminuiu em torno de 24% quando comparado ao produto *in natura*.

Os níveis de compostos fenólicos nos alimentos variam mesmo entre cultivos da mesma espécie da planta. Por exemplo, a formação dos glicosídeos de flavona e de flavonol depende da incidência da luz. Portanto, as maiores concentrações desses compostos são encontrados geralmente em folhas e em partes externas da planta (HEERMANN 1976). A formação destes compostos também varia em função de fatores genéticos, condições ambientais, variedade, nível de maturidade, processamento e armazenamento (PELEG *et al.* 1991; MAZZA 1995)

Quercetina e seus glicosídeos são antioxidantes eficazes contra a peroxidação lipídica e a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade. Este composto demonstra alta atividade antioxidante, a qual é comparável ao α -tocoferol (LY *et al.* 2005; CORZO-MARTÍNEZ *et al.* 2007). No que diz respeito à biodisponibilidade da quercetina, HOLLMAN *et al.* (1995) demonstram que este composto foi realmente absorvido em seres humanos, sendo que os seus glicosídeos foram melhores absorvidos (GRAEFE *et al.* 2001). Porém, foi demonstrado que sua absorção é baixa em comparação com outros antioxidantes da dieta como as vitaminas C e E, limitando sua capacidade de agir como antioxidante no plasma *in vivo* (LOTITO e FREI 2006). Deve-se observar, todavia, que nos diversos estudos existe grande variabilidade interindividual (LIU e YEH 2000; GRAEFE *et al.* 2001; CORZO-MARTÍNEZ *et al.* 2007). Assim, alguns indivíduos podem absorver melhor a quercetina do que outros.

Tabela 11 - Concentração (média \pm desvio padrão) de quercetina, miricetina e apigenina em alho cru, cozido e frito.

Amostras	Quercetina mg/100g*	Miricetina mg/100g*	Apigenina mg/100g*
Alho cru	12,33 \pm 0,84 ^b	Tr	Tr
Alho cozido	11,24 \pm 0,39 ^b	Tr	Tr
Alho frito	9,39 \pm 0,54 ^a	Tr	Tr

* Base seca.

Tr = valores abaixo do limite de quantificação.

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

6.4.3 Alicina

A alicina pode ser estimada pela atividade da allinase por um método que determina, por espectrofotometria, a quantidade total de 2,4-dinitrofenilhidrazina que reage com grupos carbonilas. Este se baseia na reação da alliina-allinase produzindo duas moléculas de ácido pirúvico e uma molécula de alicina.

Pode-se observar na Tabela 12 que o teor de alicina diminuiu com o processamento. Quando o alho foi cozido, o teor deste composto foi reduzido, porém esta redução não foi significativa. Em relação à amostra frita a redução foi significativa, 87%. Segundo LAGUNAS e CASTAIGNE (2008) o principal fator responsável pela inativação da allinase é a temperatura. A aliina, precursora da alicina, decompõe em temperaturas acima de 100 °C. No presente estudo observa-se que o processo de fritura a 180 °C reduziu muito o teor deste composto.

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. Os autores verificaram que o atraso no tempo de colheita em duas semanas aumenta em 20% as substâncias allina e γ -glutamicisteína e durante a cura, onde os bulbos ficam na sombra por duas semanas, a aliina aumenta em 25%.

Tabela 12 - Conteúdo de alicina (média \pm desvio padrão) em amostras de alho liofilizadas.

Amostras	Alicina ($\mu\text{mol AP/g}$)[*]
Alho cru	85,10 \pm 5,62 ^b
Alho cozido	80,42 \pm 4,44 ^b
Alho frito	11,08 \pm 0,33 ^a

*Os resultados obtidos foram expressos em μmol de ácido pirúvico (AP)/g de amostra em base seca. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$).

6.4.4 Fitosteróis

A concentração de fitosteróis (FS) nas amostras de alho liofilizadas encontra-se na Tabela 13. A fritura contribuiu com o aumento do β -sitosterol e do campesterol em relação aos produtos cru e cozido. A presença do stigmasterol foi detectada somente no alho frito. A explicação deste acontecimento está baseada no processo de fritura em óleo de soja, o qual possui estas substâncias. O óleo de soja

foi analisado e foram encontrados 288,13, 67,25 e 20,01 mg/100g de β -sitosterol, campesterol e stigmasterol, respectivamente, havendo, então, incorporação dos FS nesta amostra. No alho cru e cozido, a concentração destes FS não foi diferente estatisticamente.

Segundo LANGE (1950), o teor encontrado de fitosteróis nos dentes de alho foi de 22,5 mg/100g. No presente estudo, este teor foi de 21,45 mg/100g (soma do β -sitosterol e do campesterol). Também no estudo de HAN *et al.* (2008) o teor de fitosteróis foi 11,2 mg/100g (base úmida), valor similar ao nosso estudo em base úmida (14,69 mg/100g).

O perfil cromatográfico dos padrões β -sitosterol, campesterol, stigmasterol e das amostras de alho encontram-se no Anexo 5.

Tabela 13 - Concentração de fitosteróis (média \pm desvio padrão) em amostras de alho liofilizadas, em base seca.

Amostras	β-sitosterol mg/100g	Campesterol mg/100g	Stigmasterol mg/100g
Alho cru	9,79 \pm 0,21 ^a	0,99 \pm 0,04 ^a	ND
Alho cozido	11,66 \pm 0,54 ^a	0,61 \pm 0,06 ^a	ND
Alho frito	48,24 \pm 1,39 ^b	13,05 \pm 0,55 ^b	3,47 \pm 0,46

ND = valores abaixo do limite de detecção.

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

6.5 Compostos intermediários fluorescentes da reação de Maillard

O tratamento térmico pode induzir a formação de novos compostos que são produtos da reação de Maillard (PRM) (NICOLI *et al.* 1997; NICOLI *et al.* 1999; KAUR e KAPOOR 2001), sendo que alguns destes compostos são potencialmente tóxicos, podendo diminuir o valor nutricional de alimentos, devido ao comprometimento de aminoácidos essenciais, notadamente a lisina.

O teor de PRM nas amostras de alho está apresentado na Tabela 14.

A alta temperatura de fritura (180 °C) contribuiu com maiores valores de PRM expressos em Intensidade de Fluorescência (IF), sendo que este resultado foi 6

vezes superior ao produto cru. A cocção (100 °C) também apresentou valores bem superiores de IF quando comparados com o alho cru, porém este valor foi 2 vezes superior.

Durante o processamento térmico do café (torrefação a 200-250 °C por 5-15 minutos) ocorre a formação de um grande número de compostos voláteis como as melanoidinas e os PRM (BUETLER 2008), assim como em cereais matinais do tipo “flakes” (cozimento a 80-95 °C, e peletização por extrusão; e no final tostagem entre 150-170 °C). Altas temperaturas e baixa atividade de água são fatores que favorecem as reações de Maillard (DELGADO-ANDRADE *et al.* 2005; RUFIAN-HENARES *et al.* 2006). No estudo de SHIBAO (2010), o teor de Compostos Intermediarios Fluorescentes (CIF) livre para cereais do tipo flocos variou de 12,7 a 46,46 CIF/mg de amostra, enquanto que para os cereais tipo granola foi de 44,49 a 52,94 CIF livre/mg de amostra. Já para o café o teor medio de foi de 232,89 CIF livre/mg

Tabela 14 - Produtos da reação de Maillard (média \pm desvio padrão) em amostras de alho liofilizadas.

Amostras	IF/mg*
Alho cru	7073,89 \pm 175,12 ^a
Alho cozido	14383,39 \pm 498,62 ^b
Alho frito	45321,46 \pm 965,65 ^c

*Os resultados obtidos foram expressos em Intensidade de Fluorescência (IF) por mg de amostra em base seca.

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

6.6 Potencial antioxidante

O potencial antioxidante de um alimento deve ser avaliado por mais de um método devido à complexa composição da maioria dos alimentos. Existem métodos que avaliam o potencial antioxidante total de um alimento, pois a separação de cada antioxidante seria altamente dispendioso e provavelmente ineficiente, devido a possíveis sinergismos entre os mesmos e com a matriz (HUANG *et al.* 2005). Um dos métodos desenvolvidos é o sistema β -caroteno/ácido linoléico, o qual é

constituído por uma emulsão, sendo considerado um sistema aquoso-lipídico. Neste método o potencial antioxidante é avaliado pela capacidade de um extrato ou um antioxidante em inibir o processo de oxidação lipídica no sistema, ao longo de 120 minutos. Os antioxidantes deverão apresentar maiores valores de absorvância indicando maior inibição da oxidação lipídica (IOL). Os resultados obtidos para os alhos cru, cozido e frito estão apresentados nas Tabelas 15, 16 e 17, respectivamente.

Pode-se verificar que os resultados da IOL do alho cru (Tabela 15), cozido (Tabela 16) e frito (Tabela 17) são diferentes estatisticamente. A mistura de metanol/água foi o solvente que melhor impediu a oxidação lipídica.

KAUR e KAPOOR (2002) determinaram a atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico de diferentes vegetais, incluindo o alho cru. Os autores obtiveram dois extratos, sendo um aquoso e o outro etanólico 80%. Os resultados demonstraram que o alho inibiu em média 62% (extratos etanólico ou aquoso) a oxidação lipídica. Já no presente estudo o extrato aquoso de alho cru inibiu em média 54% e 42% para o método de extração 1 e 2, respectivamente. Para o extrato etanólico, esta inibição ficou em torno de 54% e 36%. A diferença dos resultados encontrados neste estudo com o estudo de KAUR e KAPOOR (2002) pode ser devido à concentração, além de outras características como cultivo, manuseio do alho, clima, solo, data de colheita e armazenamento.

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 índice de atividade antioxidante (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.

Nas Tabelas 15 e 16, o IAA do alho cru e cozido, respectivamente, foi melhor quando se utilizou os solventes metanol/água (método 1) e etanol (método 2). Já para o alho frito (Tabela 17), o melhor solvente foi o etanol (IAA = 1,53 e 1,47). Em

geral, a acetona não foi um bom solvente para extrair compostos com capacidade antioxidante.

FERNÁNDEZ-LÓPEZ *et al.* (2005) verificaram que o suplemento de alho 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. QUEIROZ *et al.* (2009) constataram que o alho picado sem a adição de sal e o alho frito apresentaram os melhores IAA.

Outro teste escolhido para a avaliação do potencial antioxidante total das amostras de alho foi o ORAC (Tabelas 15, 16 e 17). Esta metodologia avalia o efeito protetor da amostra, por comparação ao Trolox. Inicialmente, é medida a área sob a curva de decaimento da fluoresceína utilizando-se a amostra como agente antioxidante. A seguir, a mesma área é medida, utilizando-se o antioxidante padrão Trolox. O cálculo envolvendo estas áreas e as concentrações da amostra e do padrão indica a capacidade antioxidante da amostra. Esta é uma das poucas técnicas disponíveis que avalia não só o tempo de proteção, mas também a extensão da mesma (OU *et al.* 2001).

Os melhores valores de ORAC encontrados para os alhos cru (Tabela 15), cozido (Tabela 16) e frito (Tabela 17) foram nos extratos aquosos. Em geral, os extratos etanólicos apresentaram menor desempenho.

Tabela 15 - Potencial antioxidante (média \pm desvio padrão) dos extratos de alho cru liofilizado segundo o método e solvente de extração.

Método	Solvente	Atividade antioxidante		
		%IOL*	IAA**	ORAC ($\mu\text{mol Trolox/mL}$)***
1	aquoso	53,91 \pm 1,81 ^b	1,13 \pm 0,01 ^{a,b}	11,45 \pm 0,52 ^d
	etanol	53,86 \pm 4,01 ^b	1,06 \pm 0,06 ^a	0,83 \pm 0,07 ^a
	metanol/água (70:30 v/v)	69,86 \pm 0,44 ^c	1,51 \pm 0,04 ^c	8,01 \pm 0,28 ^{c,d}
2	aquoso	42,05 \pm 2,18 ^a	1,21 \pm 0,06 ^b	6,95 \pm 0,56 ^c
	etanol	36,26 \pm 0,26 ^a	1,59 \pm 0,01 ^c	0,78 \pm 0,12 ^a
	metanol/água (70:30 v/v)	66,64 \pm 1,28 ^c	1,14 \pm 0,01 ^{a,b}	7,23 \pm 0,55 ^{b,c}
3	acetona	42,26 \pm 3,79 ^a	1,09 \pm 0,09 ^{a,b}	1,57 \pm 0,09 ^{a,b}

1 = Nuutila *et al.* (2003) com modificações; 2 = Gorinstein *et al.* (2006b) com modificações; 3 = Gorinstein *et al.* (2006b).

*IOL = inibição da oxidação lipídica pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico.

**IAA = índice de atividade antioxidante utilizando o aparelho Rancimat. IAA = tempo de indução (h) da amostra / tempo de indução (h) do controle.

***ORAC = teste da capacidade de absorvância de oxigênio radical. Os resultados obtidos foram expressos em $\mu\text{mol Trolox/mL}$.

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

Tabela 16 - Potencial antioxidante (média \pm desvio padrão) dos extratos de alho cozido liofilizado, segundo o método e solvente de extração.

Método	Solvente	Atividade antioxidante		
		IOL (%)*	IAA**	ORAC ($\mu\text{mol Trolox/mL}$)***
1	aquoso	62,05 \pm 2,29 ^d	1,14 \pm 0,08 ^{a,b}	10,66 \pm 1,49 ^e
	etanol	47,04 \pm 1,65 ^a	1,19 \pm 0,04 ^{a,b}	0,34 \pm 0,01 ^a
	metanol/água (70:30 v/v)	57,62 \pm 1,06 ^{c,d}	1,49 \pm 0,12 ^c	3,63 \pm 0,13 ^b
2	aquoso	54,42 \pm 1,08 ^{b,c}	1,26 \pm 0,03 ^{a,b,c}	7,74 \pm 1,24 ^d
	etanol	58,96 \pm 2,14 ^{c,d}	1,42 \pm 0,13 ^{b,c}	0,96 \pm 0,14 ^a
	metanol/água (70:30 v/v)	61,07 \pm 0,52 ^d	1,14 \pm 0,20 ^{a,b}	3,12 \pm 0,20 ^b
3	acetona	50,61 \pm 2,35 ^{a,b}	1,07 \pm 0,01 ^a	1,15 \pm 0,03 ^a

1 = Nuutila *et al.* (2003) com modificações; 2 = Gorinstein *et al.* (2006b) com modificações; 3 = Gorinstein *et al.* (2006b).

*IOL = inibição da oxidação lipídica pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico.

**IAA = índice de atividade antioxidante utilizando o aparelho Rancimat. IAA = tempo de indução (h) da amostra / tempo de indução (h) do controle.

***ORAC = teste da capacidade de absorvância de oxigênio radical. Os resultados obtidos foram expressos em $\mu\text{mol Trolox/mL}$.

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

Tabela 17 - Potencial antioxidante (média \pm desvio padrão) dos extratos de alho frito liofilizado, segundo o método e solvente de extração.

Método	Solvente	Atividade antioxidante		
		%IOL*	IAA**	ORAC ($\mu\text{mol Trolox/mL}$)***
1	aquoso	62,20 \pm 2,37 ^c	1,05 \pm 0,03 ^{a,b}	13,91 \pm 0,46 ^c
	etanol	62,32 \pm 3,69 ^c	1,53 \pm 0,12 ^c	0,15 \pm 0,09 ^a
	metanol/água (70:30 v/v)	48,35 \pm 1,55 ^b	1,22 \pm 0,12 ^b	3,64 \pm 0,14 ^c
2	aquoso	68,65 \pm 3,74 ^c	1,22 \pm 0,04 ^b	10,93 \pm 0,27 ^d
	etanol	52,24 \pm 3,21 ^b	1,47 \pm 0,02 ^c	0,55 \pm 0,03 ^a
	metanol/água (70:30 v/v)	61,52 \pm 0,35 ^c	1,44 \pm 0,08 ^c	1,88 \pm 0,02 ^b
3	acetona	23,40 \pm 0,17 ^a	1,00 \pm 0,03 ^a	0,21 \pm 0,15 ^a

1 = Nuutila *et al.* (2003) com modificações; 2 = Gorinstein *et al.* (2006b) com modificações; 3 = Gorinstein *et al.* (2006b).

*IOL = inibição da oxidação lipídica pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico.

**IAA = índice de atividade antioxidante utilizando o aparelho Rancimat. IAA = tempo de indução (h) da amostra / tempo de indução (h) do controle.

***ORAC = teste da capacidade de absorvância de oxigênio radical. Os resultados obtidos foram expressos em $\mu\text{mol Trolox/mL}$.

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

Nas Figuras 16, 17 e 18, pode-se observar o efeito do processamento térmico do alho sobre o seu potencial antioxidante, avaliado por 3 métodos, sistema β -caroteno/ácido linoléico, Rancimat e ORAC.

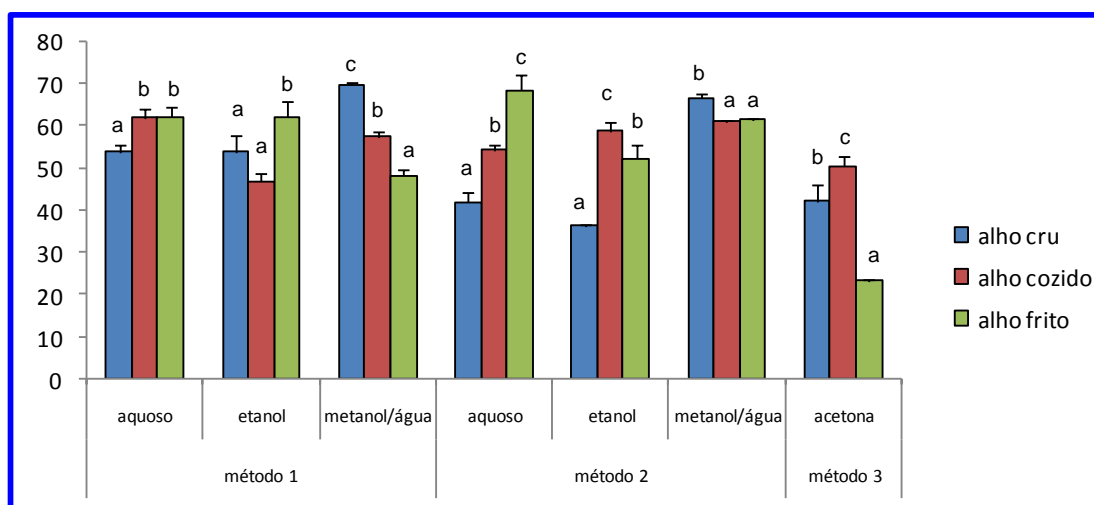
A inibição da oxidação lipídica nos extratos aquosos e etanólicos aumentou com o processamento do alho cru em cozido ou frito, o contrário foi observado para os extratos acetona e metanol/água (Figura 16). Substâncias solúveis em água ou etanol e que atuam no sistema β -caroteno/ácido linoléico são formadas pelo processamento. Esses compostos são menos solúveis em acetona ou metanol/água.

Na Figura 17, observa-se que o índice de atividade antioxidante do extrato etanólico (método 1) e do extrato metanol/água (método 2) do alho frito foi superior ao alho cru. No estudo de QUEIROZ *et al.* (2009) também foi observado que o alho frito possui melhor atividade antioxidante quando comparado com ao alho *in natura*.

O processamento do alho reduziu a atividade antioxidante pelo método ORAC para os extratos etanólicos, metanol/água e acetona. Para o extrato aquoso houve melhora da atividade antioxidante quando o alho foi frito (Figura 18).

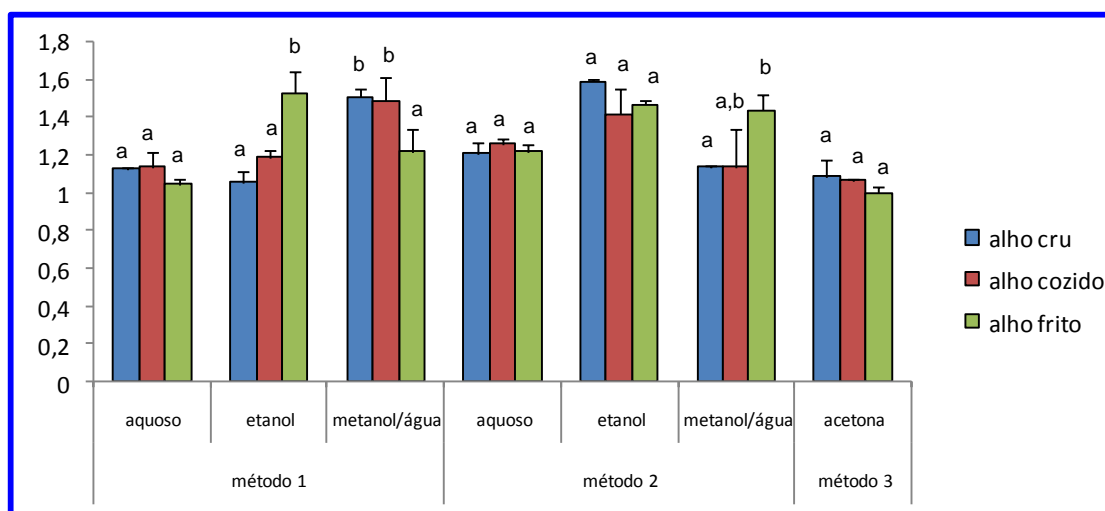
GORINSTEIN *et al.* (2010) verificaram que quando o alho foi cozido por 10 minutos a capacidade antioxidante se manteve, porém quando o mesmo foi frito esta se reduziu. Já no estudo de JIMÉNEZ-MONREAL *et al.* (2009) o potencial antioxidante do alho diminuiu com a cocção e com a fritura em 59 e 58%, respectivamente.

Figura 16 - Inibição da oxidação lipídica (IOL), pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico, dos diferentes processamentos do alho.



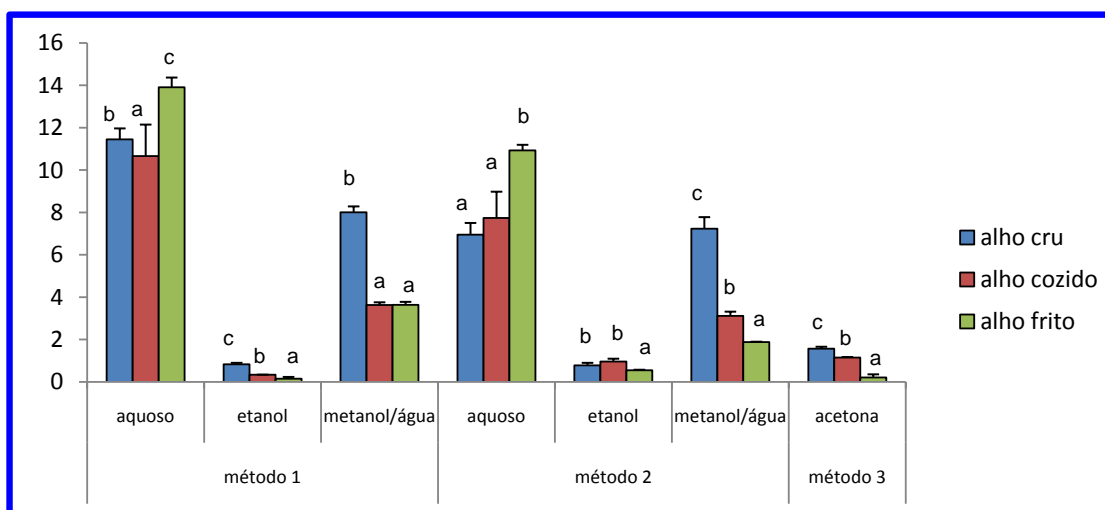
Letras diferentes no mesmo solvente e método indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Figura 17 - Índice de atividade antioxidante (IAA), utilizando o aparelho Rancimat, dos diferentes processamentos do alho.



Letras diferentes no mesmo solvente e método indicam diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$).

Figura 18 - Potencial antioxidante, pelo método ORAC ($\mu\text{mol Trolox/mL}$), dos diferentes processamentos do alho.



Letras diferentes no mesmo solvente e método indicam diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$).

7 CONCLUSÕES

O alho cru e seus produtos (frito e cozido) possuem maior quantidade de fibras solúveis que insolúveis;

O teor de ácidos graxos poliinsaturados se destaca nos alhos cru e cozido. O processamento de fritura levou a incorporação de grande quantidade de lipídios totais e de ácidos graxos *trans*;

O processamento, independente do método de extração (1 ou 2), diminuiu o teor de fenólicos nos extratos aquosos, etanólicos e com acetona. Provavelmente durante o processamento foram formados conglomerados solúveis em metanol/água, pois houve aumento no teor de fenólicos para o extrato à base dessa mistura;

A água foi o solvente que melhor extraiu compostos fenólicos do alho cru quando comparados com etanol, acetona, metanol/água. No entanto, para o alho frito o solvente mais eficiente foi metanol/água (70:30 v/v);

A cocção não afetou o teor do composto quercetina, porém a fritura diminuiu a quantidade deste composto. Não foi possível detectar miricetina e apigenina nas amostras de alho;

A temperatura utilizada na fritura do alho promoveu a diminuição do teor de alicina;

Os fitosteróis β -sitosterol e campesterol estão presentes em todas as amostras, sendo que o alho frito apresentou os maiores teores destes compostos, além de apresentar stigmasterol, provenientes do óleo de soja da fritura;

No alho cru, a mistura de metanol/água foi o solvente que contribuiu para melhor atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico. Já para o alho cozido e frito, o melhor solvente foi à água;

O IAA do alho cru e cozido foi maior quando se utilizou os solventes metanol/água (método 1) e etanol (método 2), respectivamente. Já para o alho frito, o etanol foi o melhor solvente;

Os melhores valores de ORAC encontrados para os alhos cru, cozido e frito foram nos extratos aquosos. Em geral, os extratos etanólicos apresentaram menor desempenho;

Nos métodos avaliados, a acetona não foi um bom solvente para extrair compostos com potencial antioxidante;

Com o processamento do alho cru em cozido e frito foi observado que não houve redução da atividade antioxidante avaliada pelo método Rancimat;

Os resultados corroboram com o esperado e sugerem que o alho cru e cozido podem contribuir com benefícios para saúde, haja visto que estes produtos apresentam potencial antioxidante, considerável teor de fibras solúveis, quercetina, alicina e fitosteróis, todos envolvidos em mecanismos de proteção à saúde.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

Anderson JW. Cholesterol - lowering effects of soluble fiber in human. In: Kritchevsky D e Bonfield C. (Eds.). *Dietary Fiber in Healthy and Disease*. St. Paul: Eagar Press, 1995a. p.126-145.

Anderson JW. Dietary fibre, complex carbohydrate and coronary heart disease. *Can J Cardiol* 1995b;11:55G-62G.

Anderson JW, Baird P, Davis Jr RH, et al. Health benefits of dietary fiber. *Nutr Rev* 2009;67:188-205.

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

[AOAC] Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis*. 16th ed. Arlington; 1995.

Ascherio A. *Trans* fatty acid and blood lipids. *Atheroscl Suppl* 2006;7:25-7.

Baraboi VA, Shestakova EM. Selenium: biological role and antioxidant activity. *Ukrains'kii Biokhimichnii Zhurnal* 2004;76(1):23-32.

Benklebia 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.

Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959;37(8):911-17.

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.

Buetler T. Dicarbonyls in coffee. *IMARS Highlights* 2008;2(7):5-7.

Cao G, Alessio HM, Cutler RG. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Rad Biol Med* 1993;14(3): 303-311.

Chen Z-Y, JIAO R, MA KY. Cholesterol-Lowering Nutraceuticals and Functional Foods. *J Agri. Food Che.* 2008;56:8761-73.

Corzo-Martínez M, Corzo N, Villamiel M. Biological properties of onions and garlic. *Trends in Food Sc & Techn* 2007;18:609-25.

* De acordo com as normas do Guia de Apresentação de Teses. Biblioteca/CIR – Centro de Informação e referência em Saúde Pública. 2 ed. São Paulo; 2006.

Dallongeville J, Hercberg S, Amouyel P, Dauchet LA. Fruit and consumption and risk of coronary heart disease: A meta-analysis of cohort studies. *J Nutr* 2006;136:2588-93.

Delgado-Andrade C, Rufián-Henares J, Morales FJ. Fast method to determine furosine in breakfast cereals by capillary zone electrophoresis. *European Food Res Techn* 2005;221:707-11.

Delgado-Andrade C, Rufián-Henares JA, Morales FJ. Study on fluorescence of Maillard reaction compounds in breakfast cereals. *Mol Nutr Food Res* 2006;50:799-804.

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.

[FAO] Trace mineral content of some East Asian foods. 2008. Disponível em: <http://www.fao.org/DOCREP/003/X6878E/X6878E34.htm>

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 Sc* 2005;69:371-80.

Gazzani G, Papetti A, Daglias 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.

Gorinstein S, Drzewiecki J, Leontowicz H, Leontowicz M, Najman K, Jastrzebski Z, Zachwieja Z, Barton H, Sthabsky B, Katrich H, Trakhtenberg S. Comparison of the bioactive and antioxidant potentials of fresh and cooked Polish, Ukrainian, and Israeli garlic. *J Agric Food Chem* 2005;53:2726-32.

Gorinstein S, Leontowicz M, Leontowicz H, Jastrzebski Z, Drzewiecki J, Namiesnik J, Zachwieja Z, Barton H, Zev T, Katrich H, Trakhtenberg S. Dose-dependent influence of commercial garlic (*Allium sativum*) on rats fed cholesterol-containing diet. *J Agric Food Chem* 2006a;54:4022-27.

Gorinstein S, Leontowicz H, Leontowicz M, Drzewiecki J, Najman K, Katrich E, Barasch D, Yamamoto K, Trakhtenberg S. Raw and boiled garlic enhances plasma antioxidant activity and improves plasma lipid metabolism in cholesterol-fed rats. *Life Sc* 2006b;78(6):655-63.

Gorinstein S, Jastrzebski Z, Leontowicz H, Leontowicz M, Namiesnik J, Najman K, Park Y-S, Heo B-G, Cho J-Y, Bae J-H. Comparative control of the bioactivity of some frequently consumed vegetables subjected to different processing conditions *Food Contr* 2009;20(4):407-13.

Gorinstein S, Leontowicz H, Leontowicz M, Jastrzebski Z, Najman K, Tashma Z, Katrich E, Heo B-G, Cho J-Y, Park Y-J, Trakhtenberg S. The Influence of Raw and Processed Garlic and Onions on Plasma Classical and Non-classical Atherosclerosis Indices: Investigations *In Vitro* and *In Vivo*. *Phytother Res* 2010;24:706-14.

Graefe EU, Wittig J, Mueller S, Riethling AK, Uehleke B, Drewelow B, Pforte H, Jacobasch G, Derendorf H, Veit M. Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in human. *J Clin Pharmacol* 2001;41:492-99.

Graham I, Atar D, Borch-Johnsen K, Borch-Johnsen K, Boysen G, Burell G, Cifkova R, Dallongeville J, De Backer G, Ebrahim S, Gjelsvik B, Herrmann-Lingen C, Hoes A, Humphries S, Knäpfton M, Perk J, Priori SG, Pyörälä K, Reine Z, Ruilope L, Sans-Menéndez S, Reimer WS, Weissberg P, Wood D, Yarnell J, Zamorano JL. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: executive summary. *Eur Heart J* 2007;28:2375-414.

Hamama AA, Nawar W. Thermal decomposition of some phenolic antioxidants. *J Agric Food Chem* 1991;39:1063-69.

Han J-H, Yang Y-X, Feng M-Y. Contents of Phytosterols in Vegetables and Fruits Commonly consumed in China. *Biomedical and Environmental Sciences* 2008;21(6):449-53.

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.

Herrmann K. Flavonols and flavones in food plants: a review. *J Food Technol* 1976;11:433-48.

Hertog MGL, Hollman PCH, Venema DP. Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoid in vegetables and fruits. *J Agric Food Chem* 1992;40:1591-98.

Hollman PCH, DeVries JHM, Vanleeuwen SD, Mengelers MJB, Katan MB. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *The Am J Clin Nutr* 1995;62:1276-82.

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). p.213-79.

Horwitz W. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 18th ed. Gaithersburg, Maryland: AOAC, 2005. p.15-18.

Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem* 2005;53:1841-56.

Ishimoto EY, Ferrari CKB, Bastos DHM, Torres EAFS. *In vitro* antioxidant of

Brazilian Wines and Grape Juices. *J Wine Res* 2006;17(2):107-15.

Jastrzebski Z, Leontowicz H, Leontowicz M, Namiesnik J, Zachwieja Z, Barton H, Pawelzik E, Arancibia-Avila P, Toledo F, Gorinstein S. The bioactivity of processed garlic (*Allium sativum* L.) as shown *in vitro* and *in vivo* studies on rats. *Food and Chem Toxicol* 2007;45:1626-33.

Jiménez-Monreal AM, García-Diz L, Martínez-Tomé M, Mariscal M, Murcia MA. Influence of cooking methods on Antioxidant Activity of Vegetables. *J Food Sci* 2009;74(3):H97-H103.

Johnson RB, Dutta PC. Characterization of side-chain oxidation products of sitosterol and campesterol by chromatographic and spectroscopic methods. *J Amer Oil Chem Soc* 2003;80:767-76.

Kawamoto E, Sakai Y, Okamura Y, Yamamoto Y. Effects of boiling on the antihypertensive and antioxidant activities of onion. *J Nutr Sci Vitaminol* 2004;50:171-76.

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. Antioxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *Inter J Food Sci and Techn* 2002;37:153-61.

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

Knai C, Pomerleau J, Lock K, McKee M. Getting children to eat more fruit and vegetables: A systematic review. *Prev Med* 2006;42:85-95.

Lagunas LLM, Castaigne F. Effect of temperature cycling on allinase activity in garlic. *Food Chem* 2008;111:56-60.

Lange W. Cholesterol, Phytosterol, and Tocopherol Content of Food Products and Animal Tissues. *J Am Oil Chem Soc* 1950;414-22.

Lanzotti V. The analysis of onion and garlic. *J Chromat* 2006;1112:3-22.

Lee SC, Prosky L. Determination of total, soluble and insoluble dietary fiber in foods – Enzymatic-gravimetric method, MES-TRIS buffer: collaborative study. *J AOAC* 1992;75(3):395-416.

Lee Y, Lee H-J, Lee H-S, Jang Y-A, Kim G-i. Analytical dietary fiber database for the National Health and Nutrition Survey in Korea. *J Food Comp Anal* 2008;21:S35-S42.

- Liu L, Yeh YY. Inhibition of cholesterol biosynthesis by organosulfur compounds derived from garlic. *Lip* 2000;35:197-203.
- Loliger J. The use of antioxidant in food. In: Aruoma OI, Halliwell B. *Free radicals and food additives* 1991. p.121-50.
- Lotito SB, Frei B. Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: cause, consequence, or epiphenomenon? *Free Rad Biol & Med* 2006;41:1727-46.
- Ly TN, Hazama C, Shimoyamada M, Ando H, Kato K, Yamauchi R. Antioxidative compounds from the outer scales of onion. *J Agric Food Chem* 2005;53(21):8183-89.
- Manson JE, Willett WC, Stampfer MJ, Colditz GA, Hunter DJ, Hankinson SE, Hennekens CH, Speizer FE. Body weight and mortality among women. *N Engl J Med* 1995;333:677-85.
- Marco CJ. A Simplified method for the evaluation of antioxidants. *J Am Oil Chem Soc* 1968;45:594.
- Mazza G. Anthocyanins on grapes and grape products. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1995 35(4):341-71.
- Metcalf LD, Schmitz AA; Pelka JR. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. *Anal Chem* 1966;12:514.
- Miean KH, Mohamed S. Flavonoid (Myricetin, Quercetin, Kaempferol, Luteolin, and Apigenin) Content of Edible Tropical Plants. *J Agric Food Chem* 2001;49:3106-12.
- 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 Am College Nutr* 2000;19:1-8.
- Neter J, Kutner MH, Nachtsheim CJ, Wasserman W. *Applied linear statistical models*. 4th ed. Boston:Irwin, 1996.
- 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. *Trends Food Sci Technol* 1999;10:94-100.
- 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 Chem* 2003;81:485-93.

Ogra Y, Suzuki KT. Speciation of selenocompounds by capillary HPLC coupled with ICP-MS using multi-mode gel filtration columns. *J Anal Atomic Spect* 2005;1:35-9.

Olson OE, Palmer IS, Cary E. Modification of the official fluorimetric method for selenium in plants. *J AOAC* 1975;58(1):117-21.

Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agric Food Chem* 2001;49:4619-26.

Ou CC, Tsao SM, Lin MC, Yin MC. Protective action on human LDL against oxidation and glycation by four organosulfur compounds derived from garlic. *Lip* 2003;38(3):219-24.

Pedraza-Chaverrí J, Medina-Campos ON, Avila-Lombardo R, Berenice Z-BA, Orozco-Ibarra M. Reactive oxygen species scavenging capacity of different cooked garlic preparations. *Life Sci* 2006;78:761-70.

Pedraza-Chaverrí J, Medina-Campos ON, Segoviano-Murillo. Effect of heating on peroxynitrite scavenging capacity of garlic. *Food and Chem Toxicol* 2007;45:622-27.

Peleg H, Naim M, Rouseff RL, Zehavi U. Distribution of bound and free phenolic acid in oranges (*Citrus sinensis*) and grapefruits (*Citrus paradisi*). *J Sci Food Agric* 1991;57(3):417-26.

Queiroz YS, Ishimoto EY, Bastos DHM, Sampaio GR, Torres EAFS. Garlic (*Allium sativum* L.) and ready-to-eat garlic products: *in vitro* antioxidant activity. *Food Chem* 2009;115(1):371-4.

Rufián-Henares JÁ, Delgado-Andrade C, Morales FJ. Analysis of heat-damage indices in breakfast cereals: Influence of composition. *J Cereal Sc* 2006;43:63-9.

Saldanha T, Sawaya ACF, Eberlin MN, Bragagnolo N. HPLC separation and determination of 12 cholesterol oxidation products in fish: comparative study of UV, RI and APCI-MS detectors. *J Agric Food Chem* 2006;54:4107-13.

Schwimmer S, Weston WJ. Enzymatic development of pyruvic acid in onion as a measure of pungency. *J Agric Food Chem* 1961;9(4):301-04.

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

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

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

Shibao J. Avaliação do teor de Produtos da Reação de Maillard (PRM) em cereais matinais e café. São Paulo 2010. [Dissertação de Mestrado em Ciências - Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo/USP].

Solà R, Bruckert E, Valls R-M, Narejos S, Luque X, Castro-Cabezas M, Doménech G, Torres F, Heras M, Farrés X, Vaquer J-V, Martínez J-M, Almaraz M-C, Anguera A. Soluble fibre (*Plantago ovata* husk) reduces plasma low-density lipoprotein (LDL) cholesterol, triglycerides, insulin, oxidised LDL and systolic blood pressure in Hypercholesterolaemic patients: A randomised trial. Atheroscl 2010; in press.

[TACO] Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. (2006). Segunda Edição. Disponível em: http://www.unicamp.br/nepa/taco/contar/taco_versao2.pdf

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

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

Vainio H, Weiderpass E. Fruit and Vegetables in Cancer Prevention. Nutr Cancer 2006;54:111-42.

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

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

CAPÍTULO 3

**PROCESSAMENTO DO ALHO:
INFLUÊNCIA SOBRE O POTENCIAL
ANTIOXIDANTE EM HAMSTERS
HIPERCOLESTEROLEMIZADOS**

1 INTRODUÇÃO

As doenças crônicas não-transmissíveis (DCNT), principalmente as cardiovasculares, diabetes, cânceres e doenças crônicas respiratórias causaram aproximadamente 35 milhões de mortes em 2005, o que representa quase 60% de todas as mortes no mundo (WHO 2008 e 2009). A prevalência de algumas DCNT auto-referidas no Brasil, de acordo com estudo epidemiológico realizado em 16 capitais brasileiras em 2002 e 2003, chega a 42% para hipertensão arterial e 16% para diabetes (BRASIL 2005). As mudanças de estilo de vida ocorridas na dieta e atividade física nas últimas 5 décadas foram cruciais para o aumento da prevalência das doenças crônicas.

A alimentação rica em alimentos de origem vegetal foi substituída por outras dietas carregadas em gorduras saturadas, açúcares e alimentos densamente energéticos (MATSUDO *et al.* 2002).

O desequilíbrio entre a formação e a remoção dos radicais livres está claramente associado a processos ligados a doenças agudas e crônicas, e, apesar de serem necessários estudos mais longos e consistentes, dados epidemiológicos em geral indicam benefícios em se manter dietas com maiores quantidades de antioxidantes, mais especificamente com elevadas quantidades de frutas e vegetais (WILLCOX *et al.* 2004). A existência de mecanismos naturais de prevenção contra danos celulares oxidativos como as enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase) é uma indicação de que os radicais livres possuem um papel chave nas DCNT (RAHMAN 2007; SPITELLER 2007). A aterogênese constitui um dos principais fatores de risco para doenças cardiovasculares (DCV), e parece estar fortemente associada à oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL-colesterol) (SIES *et al.* 2005). Dislipidemias, como hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia também elevam o risco de DCV, principais causas de mortalidade no Brasil (BRASIL 2005).

Na tentativa de amenizar o impacto dos processos oxidativos envolvendo radicais livres, diversas estratégias são recomendadas, como a atividade física e uma dieta à base de alimentos funcionais, que atualmente são reconhecidos como fatores

essenciais na adoção de um estilo de vida saudável (FERRARI e TORRES 2003; FERRARI 2007; NIKI 2010).

O consumo habitual de antioxidantes tem sido amplamente recomendado por seus efeitos biológicos diversos, particularmente a redução do estresse oxidativo.

O alho contém compostos fenólicos e organosulfurados que são responsáveis pelo odor, sabor, aroma, pelo potencial antioxidante e ação hipolipemiante. Diversos estudos verificaram que o potencial antioxidante e a ação hipolipemiante das frutas e hortaliças depende da forma como o alimento é consumido, seja na forma crua ou processada (GORINSTEIN *et al.* 2006b; GORINSTEIN *et al.* 2006c; JASTRZEBSKI *et al.* 2007; GORINSTEIN *et al.* 2010). As propriedades funcionais do alho podem ser influenciadas pela sua variedade, composição do solo, grau de maturação, condições climáticas, além de etapas posteriores da cadeia produtiva, como processamento, armazenamento e manipulação, porém são muito limitados os estudos nacionais *in vivo* que verificaram a influência do processamento nas propriedades bioativas do alho (HOLUB *et al.* 2002). No estudo realizado por QUEIROZ *et al.* (2009) foram observadas alterações na capacidade antioxidante quando o alho *in natura* foi picado e/ou frito, porém este estudo foi *in vitro*.

Sabe-se que os ensaios biológicos são fundamentais para elucidar que mecanismos de ação dos nutrientes e não nutrientes da dieta são responsáveis pelos benefícios observados em estudos epidemiológicos, como a prevenção e promoção da saúde. Estudos têm demonstrado associações positivas entre o consumo de várias substâncias, como os compostos fenólicos, e o aumento da expressão gênica de enzimas antioxidantes hepáticas, resultando na melhora do potencial antioxidante, que é condição atuante na inativação das espécies reativas do oxigênio e do nitrogênio (MARTINELLO *et al.* 2006; ISHIMOTO 2008; VICENTE 2009; NIKI 2010). Como ainda não há estudos da influência do processamento do alho nacional em sistemas biológicos, julgou-se pertinente verificar se a cocção e a fritura desta especiaria reduziram o potencial antioxidante em hamsters hipercolesterolemizados.

2 ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto foi encaminhado e aprovado ao Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Medicina Tropical/IMT (onde foi realizado o ensaio biológico), que regulamenta as pesquisas envolvendo animais (Anexo 6).

3 HIPÓTESE

O alho *in natura* é um alimento que contém compostos bioativos com potencial antioxidante, porém o seu consumo na forma crua no Brasil não é tão frequente, sendo utilizado usualmente na preparação de outros alimentos, onde o mesmo sofre algum tipo de processamento podendo ser picado, amassado, triturado, cozido, frito ou uma combinação destes processos. Os processamentos térmicos de fritura e cocção podem alterar o teor de seus compostos bioativos e conseqüentemente o seu potencial antioxidante.

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Avaliar o efeito do processamento térmico do alho sobre o seu potencial antioxidante em hamsters hipercolesterolemizados.

4.2 Específicos

- ❖ Avaliar o efeito do processamento do alho sobre o perfil lipídico em hamsters;
- ❖ Verificar possíveis alterações na atividade das enzimas antioxidantes catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase em tecido hepático de hamsters recebendo ração hiperlipemiante e alho cru, cozido ou frito;

- ❖ Analisar o potencial antioxidante da ração suplementada com alho no tecido hepático e no plasma dos hamsters pelos testes ORAC e ensaio cometa;
- ❖ Avaliar a atividade plasmática das enzimas de função hepática aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT).

5 MATERIAIS E MÉTODOS

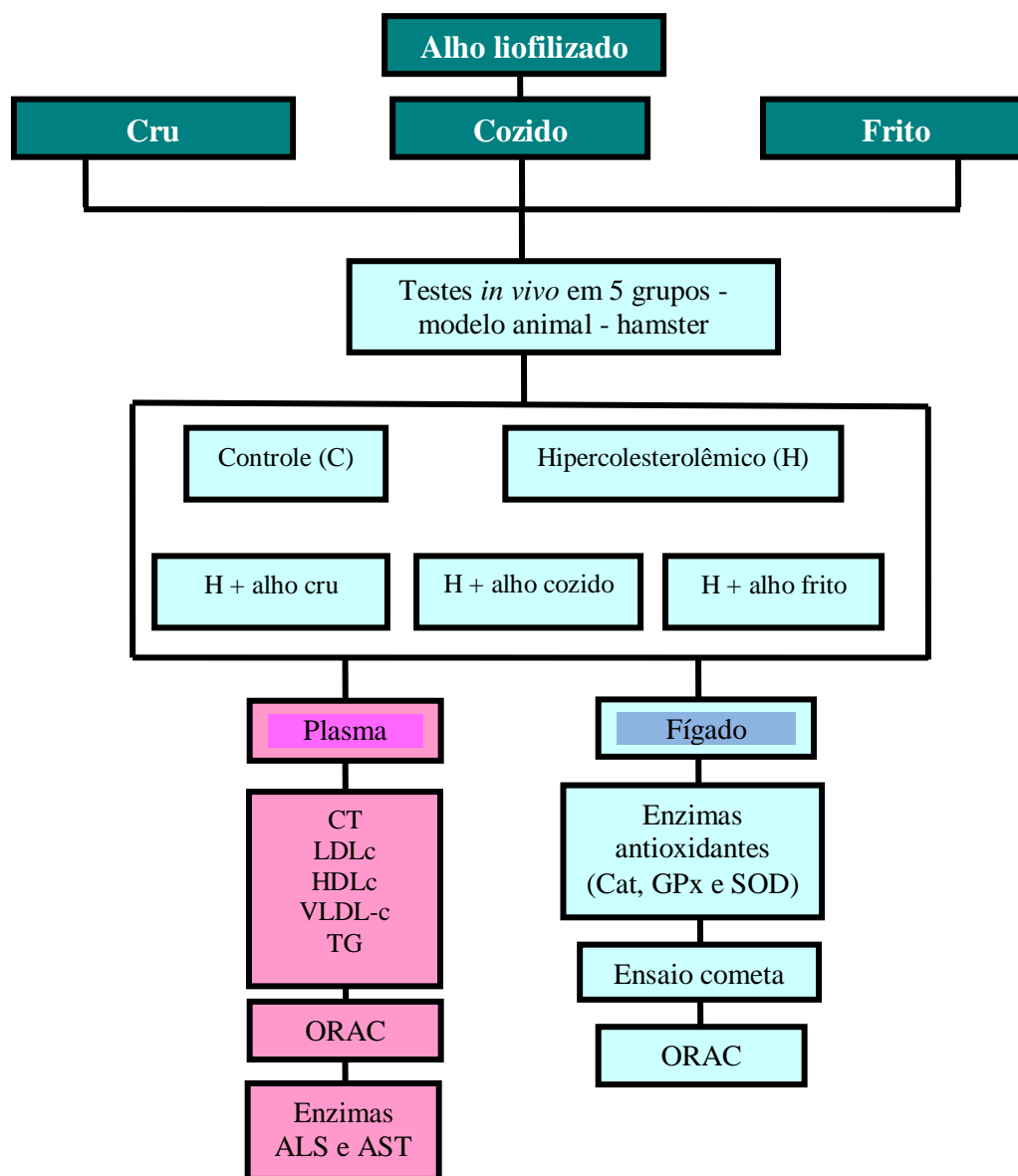
5.1 Reagentes e equipamentos

Os reagentes e os equipamentos utilizados neste projeto estão descritos no anexo 3.

5.2 Protocolo experimental *in vivo*

O protocolo experimental das análises *in vivo* está esquematizado na figura 19.

Figura 19 - Esquema do protocolo experimental *in vivo*.



CT = colesterol total; TG = triacilgliceróis; AST = aspartato aminotransferase; ALT = alanina aminotransferase; Cat = catalase; GPx = glutazona peroxidase; SOD = superóxido dismutase.

5.3 Animais

O experimento biológico foi realizado no Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (CEP-IMT).

Foram adquiridos hamsters (*Mesocricetus auratus*) machos, da linhagem Golden Syrian, com aproximadamente 30 dias de idade e peso entre 60 a 80 g. Os animais, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP), foram alojados em gaiolas individuais com maravalha (Figura 20), em ambiente com temperatura controlada de $23\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$, sob ciclo de luz (claro/escuro) de 12 horas.

Figura 20 - Alojamento dos hamsters no biotério, em gaiolas individuais.



O período do experimento teve duração de cinco semanas, incluindo o período de adaptação (aclimatação), que compreendeu uma semana, e o período experimental propriamente dito, com durabilidade de quatro semanas. Em todas as etapas os animais foram dispostos em gaiolas individuais. A limpeza das gaiolas e a pesagem dos animais foram realizadas uma vez por semana.

5.3.1 Experimento

Cinquenta hamsters foram aleatoriamente divididos em cinco grupos, de acordo com o tipo de ração fornecida (10 animais por grupo), conforme descrito a seguir:

1. Grupo controle (C) - ração com 11,1% de óleo de soja;
2. Grupo hipercolesterolêmico (H) - ração hiperlipemiante com 11% de gordura de coco e 0,1% de colesterol;
3. Grupo hipercolesterolêmico + alho cru (R) - ração hiperlipemiante com 5% de alho cru liofilizado (AOUADI *et al.* 2000);
4. Grupo hipercolesterolêmico + alho cozido (Z) - ração hiperlipemiante com 5% de alho cozido liofilizado;
5. Grupo hipercolesterolêmico + alho frito (F) - ração hiperlipemiante com 5% de alho frito liofilizado.

5.4 Rações

Ao longo do período experimental (incluindo a fase de aclimatação), ração e água foram fornecidas *ad libitum*.

O consumo da ração foi monitorado diariamente, para avaliar a aceitação e a quantidade consumida. O consumo médio diário de água foi calculado pela diferença entre a quantidade inicial e a final fornecida no bebedouro.

5.4.1 Composição da ração

Na etapa inicial (período de aclimatação), os animais receberam ração comercial (marca Nuvilab[®] CR1), na qual a composição dos nutrientes é estimada na Tabela 18. Após este período, os mesmos foram aleatoriamente divididos em grupos, de acordo com o tipo de ração fornecida.

Tabela 18 - Composição da ração comercial Nuvilab[®] CR1 fornecida no período de aclimatação.

Componente	Quantidade (%)
Umidade	máximo de 12,5%
Proteínas	mínimo de 22,0%
Extrato etéreo	mínimo de 4,0%
Material mineral	máximo de 10,0%
Matéria fibrosa	máximo de 8,0%

A composição das rações fornecidas na fase principal do ensaio biológico (Tabela 19) foi calculada com base na dieta padrão AIN-93G, recomendada para roedores (REEVES *et al.* 1993). Nesta recomendação, preconiza-se que os micronutrientes devem ser supridos pela adição de uma mistura (*mix*) específica de vitaminas e minerais. As rações desta fase foram produzidas pela empresa Nutri Experimental, especializada em insumos alimentares para animais de laboratório.

A única diferença na composição entre as rações controle e a hiperlipemiante consistiu no tipo de lipídio. Na ração hiperlipemiante, substituiu-se o óleo de soja por gordura de coco e colesterol. Para induzir à hipercolesterolemia em hamsters, diversos estudos utilizaram gorduras saturadas, estando a gordura de coco entre as fontes lipídicas mais comuns, na faixa de 10 a 12% (KOWALA *et al.* 1994; GAVINO *et al.* 2000; ISHIMOTO 2008). Quanto ao teor de colesterol, este tem sido adicionado em associação à gordura saturada, na quantidade 0,05 a 0,1% (TERPSTRA *et al.* 1991; ISHIMOTO 2008). Assim, a ração hiperlipemiante oferecida aos animais deste estudo foi constituída por 11% de gordura de coco e 0,1% de colesterol.

Tabela 19 - Composição das rações utilizadas no ensaio biológico após o período de aclimatação.

Componente	Ração controle		Ração hiperlipemiante	
	g/kg ração	%	g/kg ração	%
Caseína	200,00	20,00	200,00	20,00
Óleo de soja	111,00	11,1	-	-
Gordura de coco	-	-	110,00	11,00
Colesterol	-	-	1,00	0,10
Celulose	50,00	5,00	50,00	5,0
Amido de milho	483,50	48,35	483,50	48,35
Sacarose	100,00	10,00	100,00	10,00
Mix de minerais*	40,00	4,00	40,00	4,00
Mix de vitaminas*	10,00	1,00	10,00	1,00
L-cistina	3,00	0,30	3,00	0,30
Bitartarato de colina	2,50	0,25	2,50	0,25
Total	1000,00	100,00	1000,00	100,00

* Reeves *et al.* 1993.

5.4.2 Preparação das rações

As rações foram recebidas em pó, para serem reconstituídas com água destilada, procedimento este realizado no laboratório de Bromatologia (Faculdade de Saúde Pública/USP). Após adição de água na proporção de 50 mL de água para 100 g de pó, a mistura foi homogeneizada com espátula. Em seguida, a massa foi disposta em formas de gelo e armazenada em *freezer* (-18°C) por aproximadamente 2 horas (Figura 21). A preparação foi então retirada das formas, colocada em sacos plásticos e armazenada na mesma temperatura (-18°C), até o momento de serem oferecida aos animais.

Figura 21 - Ração



5.4.3 Perfil lipídico das rações

Em função da importância do teor lipídico (quantidade e qualidade) das rações, tanto a ração controle quanto a hiperlipemiante foram submetidas à determinação do perfil de ácidos graxos.

5.5 Coleta do material biológico

A eutanásia dos animais foi realizada no Biotério Central da Faculdade de Medicina/USP. Na véspera da eutanásia, a ração foi retirada para que os animais fossem submetidos a um período de jejum de aproximadamente 15 horas. Para a coleta de material biológico (sangue e tecido hepático), os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal com os seguintes anestésicos: cloridrato de ketamina (Dopalen[®]) e xilazina (Rompum[®]), sendo as doses administradas 80 mg/kg peso e 8 mg/kg peso, respectivamente (Figura 22).

Antes da coleta de sangue, as seringas foram lavadas com heparina (Liquemine[®]). Após a anestesia, o sangue foi coletado por punção cardíaca. Em seguida, o abdômen foi aberto por uma incisão na linha média.

O sangue foi colhido em microtubos de 2 mL, aos quais foram adicionados 10 µL de heparina previamente. Imediatamente após a coleta nos tubos, estes foram

mantidos sob temperatura de refrigeração, em maleta térmica com gelo. As amostras foram centrifugadas a 1500 x g por 15 minutos à 4°C. O sobrenadante (plasma) foi então colhido para as análises do perfil lipídico (colesterol e frações e triacilgliceróis) e para avaliação do potencial antioxidante *in vivo* (teste ORAC).

Após a coleta de sangue, o fígado foi perfundido com 20 mL de solução salina (NaCl 0,9%) pela veia porta, para remover o excesso de sangue (Figura 23). Em seguida, foi acondicionado em papel alumínio e imediatamente congelado em nitrogênio líquido. Posteriormente, foi armazenado a -80°C (em *ultrafreezer*) até a realização das análises.

Figura 22 - Anestesia



Figura 23 - Perfusão com solução salina



5.6 Determinação do perfil lipídico no plasma

Colesterol total (CT), frações de colesterol (HDL-c, LDL-c e VLDL-c) e triacilgliceróis (TG) foram quantificados no Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP). Para a aprovação da realização destas análises, o projeto desta pesquisa foi submetido e aprovado pela Comissão de Ensino e Pesquisa da Divisão de Laboratório Central do HCFMUSP (Anexo 7). Foi utilizado analisador bioquímico para a realização destas análises, por metodologia enzimática colorimétrica adaptada de ABELL *et al.* (1958), na forma de *kits* de reagentes da Roche®.

Os valores de LDL-c e VLDL-c foram somados e expressos como colesterol não-HDL. Este padrão foi adotado uma vez que a relação de lipídios em lipoproteínas de hamsters pode não ser a mesma que em humanos.

5.7 Preparo do homogenato do tecido hepático

Fragmentos de 1 g de fígado (de cada amostra) foram homogeneizados em baixa velocidade em homogeneizador ultra turrax com tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH = 7,0), em volume correspondente a três vezes o valor absoluto da massa da amostra. Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 1010 x g por 20 minutos, a 4°C. Foi colhido todo o sobrenadante em microtubos para nova centrifugação (11200 x g por 20 minutos a 4°C). Um mililitro do novo sobrenadante foi colhido, agitado a 9 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH = 7,0) e submetido à ultracentrifugação (43670 x g por 60 minutos a 4°C).

Assim, obteve-se a fração citosólica para a determinação da atividade das enzimas antioxidantes (catalase, glutathiona peroxidase e superóxido dismutase) no tecido hepático. O sobrenadante foi colhido em microtubo e armazenado à -80°C até o momento das análises. Este método foi descrito por STOCKS *et al.* (1974), e proposto por LISSI *et al.* (1986).

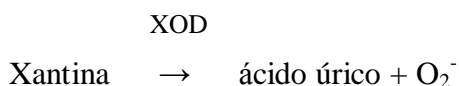
5.8 Quantificação de proteínas totais

A concentração de proteínas no homogenato de fígado foi determinada de acordo com o método de BRADFORD (1976). Dez microlitros do homogenato do tecido hepático foram diluídos em 990 µL de tampão fosfato 0,1 molar (pH=7,0). Desta diluição, 100 µL foram transferidos para a cubeta do espectrofotômetro e homogeneizados com 900 µL de água deionizada. Adicionou-se 100 µL do reagente de Bradford e após 10 minutos, foi realizada a leitura da absorbância em 595 nm. A curva-padrão de absorbância versus concentração de proteína foi preparada utilizando-se soluções contendo de 0,1 a 1,0 mg/mL de albumina sérica bovina.

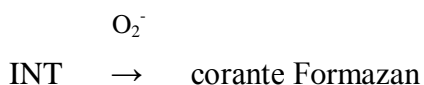
5.9 Avaliação da atividade das enzimas antioxidantes hepáticas

5.9.1 Superóxido dismutase (SOD)

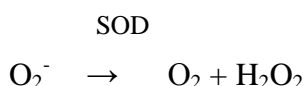
O método descrito por WOOLLIAMS *et al.* (1983), adaptada para o uso do kit Ransod[®] é baseado na inibição da reação entre o composto 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-cloreto de feniltetrazol (INT) e o radical superóxido, que originam um composto de coloração avermelhada. O papel da superóxido dismutase (SOD) é acelerar a dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular. A metodologia emprega o sistema xantina e a xantina oxidase (XOD) para gerar radicais superóxido (O_2^-) através da seguinte reação:



Por sua vez, os radicais superóxido reagem com INT, gerando um composto vermelho, o corante Formazan.



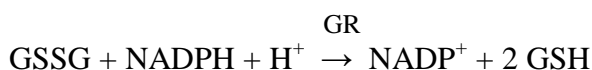
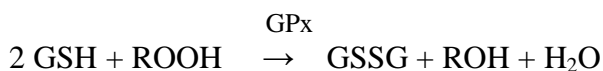
A superóxido dismutase, quando presente na amostra, irá competir com o composto INT pelos radicais superóxido, inibindo desta forma a produção do corante.



A atividade da SOD é então medida pelo decréscimo da formação do corante. Trinta e oito microlitros da amostra adequadamente diluída são misturados com 1275 μL do substrato misto (xantina 0,05 mM e corante INT 0,025 mM diluídos em tampão CAPS 40 mM / EDTA 0,94 mM). Após estabilização a 25°C, são adicionados 187 μL da solução de xantina oxidase 80 U/L diluída em água deionizada. Após homogeneização, é feita a leitura inicial e após 3 minutos em 505 nm. Quanto menor a absorbância obtida, maior foi o consumo do O_2^- , o que é proporcional à atividade da SOD.

5.9.2 Glutathione peroxidase (GPx)

O método é baseado na metodologia descrita por PAGLIA e VALENTINE (1967), adaptada para o uso do kit Ransel[®], na qual a glutathione peroxidase (GPx) catalisa a oxidação da glutathione (GSH) pelo hidroperóxido de cumeno (ROOH), formando glutathione oxidase (GSSG), peróxido de cumeno (ROH) e água. Na presença da glutathione reductase (GR) e NADPH, a glutathione oxidase é imediatamente convertida na forma reduzida, com uma oxidação concomitante da NADPH a NADP⁺ como descrito abaixo:



A concentração de GPx é medida pelo decréscimo na absorvância, devido à oxidação do NADPH a NADP⁺, o que é proporcional à atividade da GPx. Vinte e cinco microlitros da amostra adequadamente diluída são misturados com 625 µL do reagente 1 (GSH 4 mM, GR 0,5 U/L e NADPH 0,34 mM em tampão fosfato 0,5 M / EDTA 4,3 mM) e 625 µL de tampão fosfato. Após estabilização a 30°C, são adicionados 50 µL de hidroperóxido de cumeno 0,18 mM. A mistura é homogeneizada e realizadas leituras de absorvância após 1, 2 e 3 minutos a 340 nm.

5.9.3 Catalase (Cat)

A metodologia empregada (AEBI 1984) se baseia na quantificação da velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) pela enzima, mediante o decréscimo da densidade óptica a 230 nm. O consumo de H₂O₂ pode ser utilizado como uma medida de atividade da catalase, uma vez que a taxa de

decomposição do H_2O_2 é diretamente proporcional à atividade da enzima. Esta medida representa o consumo do peróxido de hidrogênio em micromoles por minuto.

O ensaio pode ser realizado na faixa de temperatura de 0 a 37° C, mas recomenda que seja conduzido em temperaturas próximas a 20°C. Neste estudo, padronizou-se a temperatura de 25°C.

Para o preparo do meio reacional, uma alíquota de 60 μ L de H_2O_2 (peridrol 30%) foi pipetada em balão de 100 mL, adicionando-se em seguida água miliQ para completar o volume. Em um frasco âmbar, 90 mL de peridrol diluído foram misturados a 5 mL de tampão Tris 1M EDTA, 5mM (pH=8,0) e 4 mL de água miliQ.

A amostra é adequadamente diluída em tampão fosfato e misturada com o meio reacional (20 μ L de amostra para 980 μ L do meio reacional). A absorbância é medida imediatamente e a cada minuto por 6 minutos. Quanto maior a redução da absorbância, maior é a atividade da catalase presente na amostra.

5.10 Potencial antioxidante

5.10.1 Teste ORAC (“Oxygen radical absorbance capacity”)

Este método foi realizado no plasma e no tecido hepático dos animais, o qual avalia o potencial antioxidante da amostra, medindo sua capacidade de proteger a fluoresceína (FL) da oxidação pelo AAPH (dihidrocloreto de 2,2'-azobis (2-aminopropanol)) no meio reacional, segundo metodologia descrita por CAO *et al.* 1993 e modificada por OU *et al.* 2001.

Um branco é preparado misturando-se 3 mL de tampão, 15 μ L de FL e 300 μ L de AAPH e, pela medida da fluorescência (excitação 494 nm, emissão = 515 nm), é calculada a área sob a curva de absorbância versus o tempo. Para a avaliação da amostra, é preparada uma solução com 2,7 mL de tampão fosfato, 300 μ L de amostra convenientemente diluída, 15 μ L de FL e 300 μ L de AAPH, repetindo-se a medição feita para o branco. A temperatura de incubação da reação é de 37 °C. A reação com os radicais livres consome a FL e a fluorescência decai.

5.10.2 Ensaio Cometa

Esta técnica foi realizada em parceria com o Prof. Doutor Marcelo Lima Ribeiro e com o Ms. Demetrius de Paiva Açaí, ambos do Laboratório de Biologia Molecular da Unidade de Farmacologia e Gastroenterologia da Universidade de São Francisco – Bragança Paulista-SP.

A fim de avaliar a ação protetora/antioxidante de compostos naturais e sintéticos, diversos trabalhos mostram que o *comet assay* (*single-cell gel electrohoresis*) é um método simples, sensível e reprodutível para a avaliação de efeitos antioxidantes *in vivo* e *in vitro*. Através deste é possível detectar quebras em fitas simples e duplas e oxidação em bases de DNA (FESTA *et al.* 2001, OLDHAM *et al.* 2002; SHI *et al.* 2002; PORRINI *et al.* 2005; DEMETRIUS 2009).

Após o sacrifício dos animais parte do tecido hepático foi congelado em ultrafreezer a - 80°C para a determinação dos danos oxidativos do DNA nas células hepáticas por meio do *comet assay* (POOL-ZOBEL *et al.* 1994). Resumidamente, 1,5 g de amostra foram colocadas cuidadosamente sobre 1,5 mL de HISTOPAQUE-1077 e centrifugados a 400 x g por 30 minutos a 20°C. Descartado o sobrenadante, as amostras foram ressuspensas em 500 µL de Hank's. Aliquotas foram retiradas para avaliar a viabilidade. Foram descartadas aquelas com viabilidade inferior a 75%.

A versão alcalina do ensaio do cometa foi realizada de acordo com SINGH *et al.* (1988). Em suma, 10 µL da suspensão celular previamente obtida foram misturados à agarose *low melting point* 0,5% (Promega), postos sobre uma lâmina e cobertos com uma lamínula. Estas foram imersas em uma solução de lise gelada (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% SDS, pH 10 com 1% Triton X-100 e 10% DMSO) e permaneceram a 4°C *overnight*. Este procedimento removeu o citoplasma e a maior parte das proteínas nucleares, deixando o DNA *supercoiled* em um formato nucleóide. A presença de quebras no DNA relaxa a espiralização do DNA e a subsequente eletroforese alcalina relaxa ainda mais as alças do DNA, que ficarão, após a eletroforese, com aspecto de um cometa. O tamanho da cauda de cometa reflete a extensão das rupturas das hélices de DNA, e pode ser quantificado por métodos de intensificação de imagem e análise computacional.

Após a lise, as lâminas foram expostas a um tampão alcalino (1 mM EDTA e 300 mM NaOH, pH ~ 13,4) por 40 minutos a 4°C. A eletroforese foi realizada neste tampão a 4°C por 30 minutos a 25V e 300 mA. Após a corrida as lâminas foram neutralizadas (0,4 M Tris, pH 7,5), coradas com *SYBR SafeTM* (Invitrogen) e analisadas em microscópio de fluorescência. Cem células foram aleatoriamente selecionadas (50 de cada réplica) e analisadas usando o *software* Komet 5.5 (Kinetic Imaging, USA).

5.11 Atividade das enzimas hépáticas aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase

5.11.1 Aspartato aminotransferase (AST) ou transaminase oxalacética (TGO)

A atividade desta enzima foi medida pela técnica descrita por REITMAN e FRANKEL (1957), adaptada para o uso do kit AST/TGO Liquiform[®]. A TGO promove a transferência do grupamentos amina de α -aminoácidos para α -cetoácidos. O oxaloacetato formado é determinado através da formação de hidrazona que apresenta intensa coloração em meio alcalino.

Para a curva-padrão foram preparadas soluções contendo de 0 a 0,4 mL de piruvato de sódio, de 0,6 a 1,0 mL de substrato para TGO (tampão, ácido α -cetoglutárico, ácido L-aspartico e azida sódica), 0,2 mL de água deionizada e 1,0 mL do reagente de cor (2,4-dinitrofenilhidrazina e HCl). Após 20 minutos à temperatura ambiente, foram adicionados 10 mL de NaOH. Posteriormente, após 5 minutos à temperatura ambiente, as absorvâncias destes padrões foram verificadas a 505 nm, sendo que estes valores equivalem a 0 a 190 U/mL de TGO. Para as amostras, foi utilizado 0,25 mL de substrato para TGO (2 minutos a 37°C), adicionado 0,05 mL da amostra (60 minutos a 37°C), 0,25 mL do reagente de cor (temperatura ambiente por 20 minutos) e 2,5 mL de NaOH. Após 5 minutos à temperatura ambiente, a absorvância é verificada a 505 nm e a atividade enzimática é obtida na curva-padrão.

5.11.2 Alanina aminotransferase (ALT) ou transaminase pirúvica (TGP)

A atividade plasmática desta enzima foi quantificada conforme a técnica descrita por REITMAN e FRANKEL (1957), adaptada para o uso do kit ALT/TGP Liquiform[®]. Inicialmente foram preparadas as soluções para a curva-padrão contendo de 0 a 0,4 mL de piruvato de sódio, de 0,6 a 1,0 mL de substrato para TGP (tampão, ácido α -cetoglutárico, L-alanina e azida sódica), 0,2 mL de água deionizada e 1,0 mL do reagente de cor (2,4-dinitrofenilhidrazina e HCl). Após 20 minutos à temperatura ambiente, foram adicionados 10 mL de NaOH. Passados 5 minutos à temperatura ambiente, as absorvâncias foram medidas em 505 nm, sendo que estes valores equivalem a 0 a 150 U/mL de TGP. Para as amostras, foi utilizado 0,25 mL de substrato para TGP (2 minutos a 37°C), adicionado 0,05 mL da amostra (30 minutos a 37°C), 0,25 mL do reagente de cor (temperatura ambiente por 20 minutos) e 2,5 mL de NaOH. Após 5 minutos à temperatura ambiente, a absorvância foi verificada a 505 nm e a atividade enzimática é obtida através da curva-padrão. A ALT promove a transferência do grupo amino da L-alanina para o α -cetoglutarato com a formação de glutamato e piruvato. Este último é medido através da formação de hidrazona que apresenta intensa coloração em meio alcalino.

5.12 Análise dos dados

Os resultados das diferentes análises foram apresentados como média e desvio padrão e para compará-los foi realizada análise de variância (NETER *et al.* 1996) e o teste de Tukey para as comparações múltiplas. Todas as análises foram realizadas em 10 replicatas. 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 16.0 for Windows.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Ensaio Biológico

6.1.1 Perfil lipídico das rações

O principal diferencial na composição entre as dietas controle e hiperlipemiante ocorreu na fração lipídica. Assim, determinou-se o perfil de ácidos graxos nas duas rações (Tabela 20).

Os valores relativos à quantificação de ácidos graxos corresponderam ao planejamento do desenho experimental, no qual a ração controle deveria conter acima de 70% de lipídios insaturados e a ração hiperlipemiante acima de 70% de lipídios saturados. Sabe-se que os ácidos graxos láurico e mirístico induzem a hipercolesterolemia endógena em modelos animais, particularmente em hamsters (ALEXAKI *et al.* 2004; ISHIMOTO 2008) e porquinhos-da-Índia (ZERN *et al.* 2003).

Os cromatogramas destas análises encontram-se no Anexo 8.

Tabela 20 - Perfil de ácidos graxos das rações controle e hiperlipemiante.

Ácido Graxo	Ração controle (%)	Ração hiperlipemiante (%)
Caprílico (C8:0)	0,00	2,52
Cáprico ((C10:0)	0,00	3,26
Láurico (C12:0)	0,04	36,07
Mirístico (C14:0)	0,19	14,27
Palmítico (C16:0)	11,31	12,24
Estearico (C18:0)	3,34	5,50
Oléico (C18:1 n9)	25,67	18,39
Linoléico (C18:2 n6)	53,96	7,31
Gama Linolênico (C18:3 n6)	0,17	0,03
Cis-11-Eicosadienóico (C20:1)	5,32	0,41
Total saturados	14,88	73,86
Total monoinsaturados	30,99	18,80
Total poliinsaturados	54,13	7,34

6.1.2 Peso dos animais, consumo de ração e água

A ração e a água foram oferecidos *ad libitum* aos animais, e após 1 mês de tratamento foram avaliados os dados relativos ao consumo de ração e água, bem como o ganho de peso (Tabela 21).

No que se refere ao consumo de ração, não houve diferença entre os grupos ($p < 0,05$).

O grupo controle ingeriu mais água do que os demais grupos. O consumo de água foi relativamente inferior ao encontrado por outra pesquisa com hamsters, que foi, em média, 17 mL/dia (MARTINELLO *et al.* 2006), porém comparando com o estudo de ISHIMOTO (2008) a ingestão foi a mesma. A diferença com o estudo de MARTINELLO *et al.* (2006) provavelmente está relacionada ao elevado teor de umidade das dietas deste estudo, que variou de 35,8% para ração hiperlipemiante e 37,8% para ração controle. O alto teor de umidade se justifica por ser a dieta

reconstituída com água, sem passar pelo processo de peletização. Em geral, o teor de umidade em dietas peletizadas para roedores varia de 7 a 10% (FROTA *et al.* 2008; MENDONÇA *et al.* 2009).

O coeficiente de eficiência alimentar (CEA) foi menor para os grupos H e R e maior para os grupos C, Z e F. De forma coerente, os grupos C, Z e F foram os grupos que apresentaram maior ganho de peso. O grupo R teve menor incremento de peso, ingerindo a mesma quantidade de ração.

Tabela 21 - Peso inicial e final, ganho de peso, consumo de ração e água e coeficiente alimentar (média \pm desvio-padrão) dos hamsters.

Variáveis	Grupos				
	C	H	R	Z	F
Peso inicial (g)	60,35 \pm 5,51 ^a	62,06 \pm 3,72 ^a	66,63 \pm 16,23 ^a	56,63 \pm 13,07 ^a	61,40 \pm 13,19 ^a
Peso final (g)	122,70 \pm 15,30 ^a	122,03 \pm 21,49 ^a	114,50 \pm 19,43 ^a	121,70 \pm 13,34 ^a	126,40 \pm 12,68 ^a
Ganho de peso(g)	62,35 \pm 13,52 ^{a,b}	54,40 \pm 10,14 ^{a,b}	47,87 \pm 10,94 ^a	65,07 \pm 10,08 ^b	65,00 \pm 16,62 ^b
Consumo de água (mL/dia)	16,22 \pm 6,95 ^b	10,44 \pm 2,76 ^a	11,11 \pm 3,70 ^a	11,73 \pm 5,71 ^a	11,02 \pm 2,65 ^a
Consumo de ração (g/dia)*	9,13 \pm 0,64 ^a	8,87 \pm 0,53 ^a	8,59 \pm 0,91 ^a	9,43 \pm 1,07 ^a	8,66 \pm 0,70 ^a
CEA (%)	22,76 \pm 4,01 ^{a,b,c}	20,44 \pm 2,82 ^{a,b}	18,58 \pm 2,74 ^a	23,00 \pm 2,53 ^{b,c}	25,02 \pm 4,72 ^c

* Base seca

CEA = coeficiente de eficiência alimentar (ganho de peso/consumo de ração total x 100).

C = grupo controle; H = grupo hipercolesterolêmico; R = grupo hipercolesterolêmico + alho cru; Z = grupo hipercolesterolêmico + alho cozido; F = grupo hipercolesterolêmico + alho frito.

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

6.1.3 Perfil lipídico plasmático

O grupo hipercolesterolêmico (H) apresentou concentração plasmática de colesterol total (CT) 61% maior em relação ao grupo controle (C), como exposto na Tabela 22. Tal resultado comprova o efeito hiperlipemiante dos lipídios da ração fornecida ao grupo H. O aumento do colesterol da ração hiperlipemiante é próximo ao encontrado no estudo de ISHIMOTO (2008). Todos os grupos tratados com alho apresentaram CT significativamente inferior ao grupo H, sendo que houve uma

redução de até 19%, resultado próximo ao estudo de GORINSTEIN *et al.* (2006c) e JASTRZEBSKI *et al.* (2007).

Na fração HDL-colesterol (HDL-c), todos os grupos que receberam alho apresentaram resultados superiores ao grupo controle.

A fração do colesterol não-HDL representa a soma de LDL-c e VLDL-c. Os resultados indicaram que, na fração de colesterol não-HDL, o valor de todos os grupos tratados com alho foi inferior ao do grupo H. Os valores desta diferença variaram de 13% (grupo F) a 29% (grupo Z).

No estudo de GORINSTEIN *et al.* (2006b) foi observado que quando os animais foram alimentados com ração contendo colesterol e alho cru ou cozido (100°C por 20 minutos) houve uma diminuição significativa do CT e LDL-c. AOUADI *et al.* (2000) também constataram uma redução de 12,2% do CT dos ratos alimentados com uma ração rica em colesterol e 10% de alho cru.

Os resultados referentes às concentrações de triacilgliceróis (TG) apresentaram diferenças entre os grupos. Todos os grupos que receberam alho na ração apresentaram valores superiores ao grupo C; porém em relação ao grupo H, os resultados médios foram de 10% (grupo F) a 23% (grupo Z) inferiores. Este dado indica que a ração com gordura de coco e colesterol elevou consideravelmente a concentração de TG no modelo animal adotado (grupo H), sendo 144% superior ao grupo controle. No estudo de JASTRZEBSKI *et al.* (2007) não houve diminuição do TG quando o animal foi suplementado com alho cru ou cozido por 20, 40 e 60 minutos.

Outros estudos demonstraram que o alho possui efeito hipocolesterolêmico quando adicionados a ração de animais (BANERJEE *et al.* 2002; OU *et al.* 2003).

Os grupos que receberam a ração suplementada com o alho cru, cozido e frito provavelmente se beneficiaram com os efeitos das fibras solúveis (ANDERSON 1995a; ANDERSON *et al.* 2009), da alicina (DURAK *et al.* 2004), da quercetina (LANZOTTI 2006; UTESCH *et al.* 2008; GORINSTEIN *et al.* 2010) e dos fitosteróis (NORMÉN 2002; RYAN *et al.* 2009) que possuem efeitos hipocolesterolêmicos.

No estudo de DURAK *et al.* (2004) foi verificado que o extrato de alho reduziu de forma significativa o nível de colesterol total e dos triacilgliceróis

plasmáticos em humanos; além de aumentar a fração HDL-c, melhorar o potencial antioxidante e a resistência à oxidação e, diminuir os níveis de MDA, que é um importante indicador da peroxidação lipídica. Com relação à propriedade do alho em reduzir o colesterol, tem sido sugerido que alguns componentes do alho, como os compostos organosulfurados (GEBHARDT e BECK 1996) podem agir como inibidores de algumas enzimas hepáticas, como HMG-CoA redutase (hidroxi metil glutaril-CoA redutase), que participa da síntese do colesterol. Sabe-se que esta enzima está implicada na conversão de acetato em ácido mevalônico na cadeia de reações químicas, que ocorrem para a síntese de colesterol. Com a redução da quantidade de colesterol formado no hepatócito, ocorre maior síntese de receptores de membrana que captam lipoproteínas ricas em colesterol, as quais se reduzem na circulação (BURSILL *et al.* 2001; PAL *et al.* 2003).

O mecanismo de ação dos fitosteróis em relação à redução das concentrações plasmáticas de colesterol envolve a inibição intestinal de absorção do colesterol e diminuição da síntese de colesterol hepático (NORMÉN 2002; CHEN *et al.* 2008; RYAN *et al.* 2009).

Os efeitos das fibras solúveis na diminuição do colesterol estão relacionados com suas propriedades de formação de gel (ANDERSON 1995a; ANDERSON *et al.* 2009), a diminuição da absorção de ácidos biliares e a ação dos ácidos graxos de cadeia curta produzidos na fermentação sobre a função hepática (ANDERSON 1995b).

Tabela 22 - Média \pm desvio-padrão de colesterol total (CT), HDL-c, não HDL-c e triacilgliceróis (TG) nos grupos experimentais.

Grupos	Variáveis			
	CT (mg/dL)	HDL-c (mg/dL)	não HDL-c (mg/dL)	TG (mg/dL)
C	94,96 \pm 5,06 ^a	69,10 \pm 5,61 ^a	29,40 \pm 1,84 ^a	87,30 \pm 4,42 ^a
H	154,94 \pm 3,36 ^c	95,30 \pm 4,03 ^c	60,00 \pm 2,45 ^d	198,70 \pm 4,72 ^d
R	132,38 \pm 9,80 ^b	88,30 \pm 8,15 ^b	45,30 \pm 2,26 ^b	157,40 \pm 1,97 ^b
Z	124,62 \pm 8,80 ^b	81,30 \pm 7,47 ^b	42,60 \pm 4,01 ^b	152,10 \pm 9,86 ^b
F	127,44 \pm 7,29 ^b	78,70 \pm 8,74 ^b	52,40 \pm 4,88 ^c	178,20 \pm 10,43 ^c

C = grupo controle; H = grupo hipercolesterolêmico; R = grupo hipercolesterolêmico + alho cru; Z = grupo hipercolesterolêmico + alho cozido; F = grupo hipercolesterolêmico + alho frito. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$).

6.1.4 Determinação da atividade antioxidante das enzimas hepáticas

Os resultados relativos à atividade das enzimas glutathione peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD) e catalase (Cat) estão apresentados na Tabela 23.

O grupo H apresentou atividade enzimática significativamente inferior aos demais grupos, nas três enzimas avaliadas. Este dado reforça a hipótese de que dietas ricas em colesterol e pobre em antioxidantes contribuem para um elevado grau de lipoperoxidação, exacerbando a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e conseqüentemente inibindo a atividade das enzimas antioxidantes (ALÍA *et al.* 2003; ISHIMOTO 2008).

Com relação à atividade das enzimas GPx, SOD e Cat observa-se que todos os grupos tratados com alho (R, Z e F) apresentaram valores significativamente superior ao grupo H e iguais ao grupo C, ou seja, quando o animal hipercolesterolêmico foi tratado com alho, a atividade destas enzimas não foi alterada em relação aos seus valores de normalidade (grupo C).

No estudo de DURAK *et al.* (2004) foi observado, em humanos, que a ingestão de extrato aquoso de alho (20% p/v) durante 6 meses não aumentou a atividade das enzimas SOD, Cat e GPx. Porém, em outros estudos, foi observado que a ingestão de extrato de alho aumentou a atividade de algumas enzimas

antioxidantes. Por exemplo, CHEN *et al.* (2003) relataram aumento da atividade da SOD e diminuição da GPx em tecidos hepático de ratos alimentados com dieta rica em óleo de alho. BANERJEE *et al.* (2002) encontraram aumento da SOD, porém diminuição da GPx, quando os animais (ratos) ingeriram extrato aquoso de alho (125 mg/kg de peso dos animais) durante 30 dias. WU *et al.* (2001) verificaram que houve aumento significativo das enzimas superóxido dismutase e das glutatonas peroxidase e redutase quando os animais ingeriram óleo de alho (200 mg/kg) ou compostos organosulfurados dialil disulfito (80 mg/kg) e dialil trissulfito (70 mg/kg). Porém quando estes ingeriram o composto dialil sulfito não houve aumento destas enzimas (20 mg/kg e 80 mg/kg).

Outras pesquisas comprovaram aumento da atividade enzimática em modelo animal (roedores), utilizando café (VICENTE 2009); compostos antioxidantes da uva (ISHIMOTO 2008) e polpa de tamarindo (MARTINELLO *et al.* 2006).

Tabela 23 - Atividade das enzimas antioxidantes. Valores em média \pm desvio padrão.

Grupos	Variáveis		
	GPx ($\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg ptn}$)	SOD (U/mg ptn)	Cat ($\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg ptn}$)
C	$0,83 \pm 0,07^b$	$2,13 \pm 0,11^{b,c}$	$11,28 \pm 1,16^{b,c}$
H	$0,64 \pm 0,06^a$	$1,54 \pm 0,09^a$	$9,22 \pm 0,43^a$
R	$0,87 \pm 0,07^{b,c}$	$2,19 \pm 0,10^{b,c}$	$12,40 \pm 1,04^c$
Z	$0,95 \pm 0,04^c$	$2,23 \pm 0,14^c$	$15,41 \pm 1,54^d$
F	$0,88 \pm 0,06^{b,c}$	$2,07 \pm 0,06^b$	$10,38 \pm 0,97^{a,b}$

C = grupo controle; H = grupo hipercolesterolêmico; R = grupo hipercolesterolêmico + alho cru; Z = grupo hipercolesterolêmico + alho cozido; F = grupo hipercolesterolêmico + alho frito. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$).

6.1.5 Potencial antioxidante

6.1.5.1 Teste ORAC (“Oxygen radical absorbance capacity”)

Para o teste do potencial antioxidante total por ORAC, tanto no plasma quanto no tecido hepático, a média do grupo H foi menor quando comparado com os

grupos que receberam ração rica em colesterol e alho (R, Z e F) (Tabela 24). Neste caso, o processo de fritura (grupo F) não alterou o potencial antioxidante quando comparado com o grupo que recebeu alho cru (R). A ingestão de alho contribuiu com o aumento da capacidade antioxidante em hamsters hipercolesterolemizados, observado pelos altos valores de ORAC no plasma e no tecido hepático. O potencial antioxidante do grupo Z foi 17% (plasma) e 21% (tecido hepático) maior do que o grupo H. No estudo de VICENTE (2009) o grupo de animais que consumiram 2 mL de infusão de café foi 25,1% superior ao obtido para o grupo que não consumiu esta bebida.

Tabela 24 - Capacidade antioxidante total por ORAC no plasma e no tecido hepático de hamsters.

Grupos	ORAC ($\mu\text{mol ET}$)	
	Plasma	Tecido Hepático
C	7261,20 \pm 511,27 ^c	14449,91 \pm 1384,82 ^b
H	5611,11 \pm 367,59 ^a	11926,94 \pm 1299,76 ^a
R	6204,24 \pm 824,74 ^{a,b}	12990,32 \pm 1333,90 ^{a,b}
Z	6836,75 \pm 524,80 ^{b,c}	14056,66 \pm 1702,30 ^b
F	5984,83 \pm 284,46 ^a	13214,60 \pm 1210,91 ^{a,b}

ET = equivalentes de trolox.

C = grupo controle; H = grupo hipercolesterolêmico; R = grupo hipercolesterolêmico + alho cru; Z = grupo hipercolesterolêmico + alho cozido; F = grupo hipercolesterolêmico + alho frito.

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

6.1.5.2. Ensaio Cometa

Os níveis de danos oxidativos ao DNA do tecido hepático foram avaliados por meio do ensaio cometa, como indicador da capacidade antioxidante. Os resultados estão descritos na Tabela 25. Os grupos hipercolesterolêmicos suplementados com alho cru e cozido impediram danos oxidativos ao DNA quando comparado com o grupo que não recebeu suplementação (H). O grupo F causou danos ao DNA na mesma proporção do grupo sem suplementação (H).

Os dados apresentados no estudo de MIRANDA *et al.* (2008) indicaram que o chá mate não é genotóxico no fígado, células dos rins e bexiga dos animais estudados. A ingestão regular desta bebida aumentou a resistência do DNA contra danos oxidativos ao DNA induzidos por H₂O₂. Estes resultados sugeriram que o chá mate pode proteger contra danos ao DNA, proporcionados pela atividade antioxidante e compostos bioativos presentes nesta bebida. Em nosso estudo, da mesma forma, os alhos cru e cozido impediram danos ao DNA, devido à presença de compostos bioativos nestas amostras.

Tabela 25 - Efeito da intervenção com alho nos níveis de danos oxidativos ao DNA avaliada pelo Ensaio cometa.

Grupos	Danos ao DNA (TM)
C	6,76 ± 1,00 ^a
H	8,69 ± 0,88 ^b
R	7,57 ± 1,14 ^a
Z	5,31 ± 0,71 ^a
F	9,13 ± 1,28 ^b

Os valores representam a média do *tail moment* (TM) em unidades arbitrárias ± o desvio padrão de 100 células.

C = grupo controle; H = grupo hipercolesterolêmico; R = grupo hipercolesterolêmico + alho cru; Z = grupo hipercolesterolêmico + alho cozido; F = grupo hipercolesterolêmico + alho frito.

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

6.1.6 Atividade das enzimas hepáticas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT)

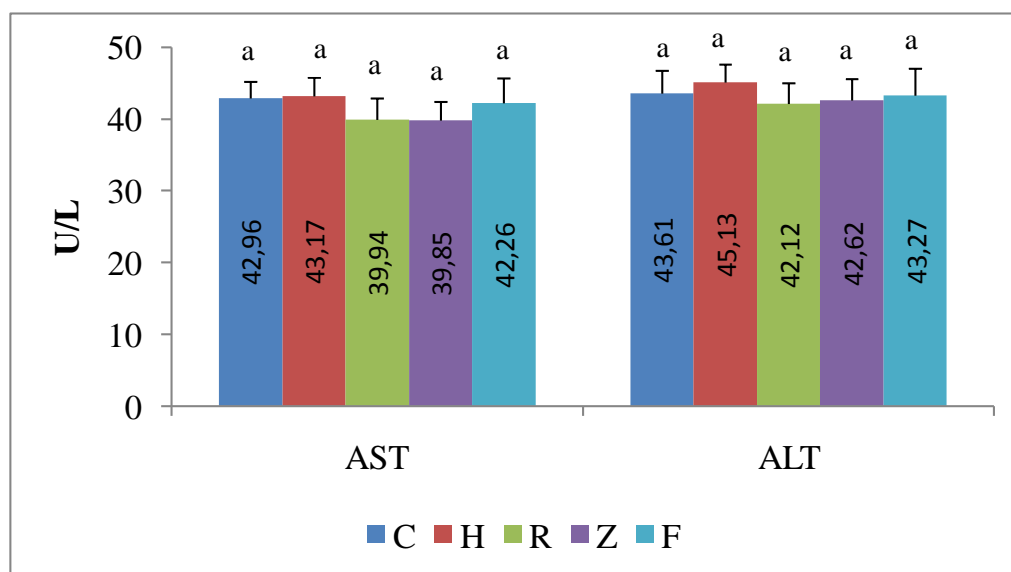
A dosagem dos biomarcadores hepáticos AST (aspartato aminotransferase) e ALT (alanina aminotransferase) nos animais foi realizada a fim de se investigar possível ocorrência de danos estruturais ou funcionais em algum tecido do animal, pois se isso ocorresse os benefícios do alho citados anteriormente teriam sua importância reduzida. De acordo com PARI *et al.* (2008), SHANMUGARAJAN *et al.* (2008) e VICENTE (2009), danos hepáticos são evidenciados pela alteração da atividade destas enzimas. Estes biomarcadores são extremamente sensíveis e de fácil

detecção, pois os danos causados às células hepáticas alteram o seu metabolismo, causando aumento destas enzimas no citoplasma e liberação no plasma após o dano hepático.

Os resultados das enzimas AST e ALT estão apresentados na Figura 24. O plasma foi analisado sem diluição utilizando-se os kits para AST e ALT já citados. Para o grupo controle a média da atividade das enzimas AST e ALT foi 42,96 e 43,61 U/L, respectivamente, comparáveis aos valores 44,40 e 50,07 U/L encontrados por MARTINELLO *et al.* (2006). Pode-se observar que não foram detectadas alterações destas enzimas nos grupos recebendo ração hiperlipemiante e 5% de alho cru, cozido ou frito, durante 4 semanas, quando comparados com os grupos C e H.

FLORA *et al.* (2009) verificaram que a atividade destas enzimas não sofreram alterações quando o grupo controle recebeu 500 mg/kg de extrato aquoso de alho.

Figura 24 - Atividade das enzimas AST e ALT.



C = grupo controle; H = grupo hipercolesterolêmico; R = grupo hipercolesterolêmico recebendo alho cru; Z = grupo hipercolesterolêmico recebendo alho cozido; F = grupo hipercolesterolêmico recebendo alho frito.

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$).

7 CONCLUSÕES

- # O grupo que recebeu alho cru teve menor ganho de peso, mesmo consumindo a mesma quantidade de ração do grupo cozido e frito;
- # Os alhos cru e cozido e frito foram eficazes na redução de lipídios no plasma dos hamsters;
- # Apenas os grupos hipercolesterolêmicos suplementados com alho cru e cozido obtiveram melhora no potencial antioxidante em relação ao grupo hipercolesterolêmico não suplementado, observado nos testes ORAC (tanto no plasma quanto no tecido hepático) e no ensaio cometa;
- # No tecido hepático houve aumento da atividade das enzimas antioxidantes, catalase, glutathione peroxidase e superóxido dismutase para todos os grupos suplementados com alho;
- # Não ocorreram danos estruturais ou funcionais no tecido hepático dos animais, visto que não ocorreu alteração na atividade das enzimas AST (aspartato aminotransferase) e ALT (alanina aminotransferase);
- # Os resultados reafirmam o esperado e sugerem que os alhos cru e cozido podem contribuir com benefícios para saúde, haja vista que estes produtos apresentam alto potencial antioxidante no plasma e no tecido hepático e promovem aumento na atividade das enzimas antioxidantes que estão envolvidas em mecanismos de proteção à saúde.

8 CONCLUSÃO FINAL

Os resultados obtidos neste estudo reafirmam a hipótese de que os compostos bioativos do alho são potencialmente benéficos à saúde, uma vez que foi demonstrado o seu potencial antioxidante *in vitro* e *in vivo*, além do efeito hipocolesterolêmico em hamsters.

Com relação aos compostos responsáveis pelo potencial antioxidante, tanto os compostos fenólicos quanto os compostos organosulfurados, como a alicina, podem ter contribuído com os resultados apresentados. O efeito hipolipemiante se deve aos compostos mencionados acima (fenólicos e alicina) e também à presença dos fitostéreis e das fibras presentes nas amostras de alho cru, cozida e frita.

A cocção do alho não interferiu nos efeitos antioxidante e hipolipemiante, porém a fritura reduziu estes efeitos.

Contudo, vale ressaltar que a quantidade de alho ingerida pelos animais é alta, sendo que esta seria de difícil consumo humano. Assim, outros estudos são necessários para avaliar o efeito da dose/resposta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

Abell LL, Levy BB, Brodie BB, Kendall Fe. Cholesterol in serum. Standard Methods of Clinical Chemistry (v.2), New York: Academic Press, 1958. p.26.

Aebi H. Catalase *in vitro*. Methods in Enzymology, New York 1984;105:121-26.

Alexaki A, Wilson TA, Atallah MT, Handelman G, Nicolosi RJ. Hamsters fed diets high in saturated fat have increased cholesterol accumulation and cytokine production in the aortic arch compared with cholesterol-fed hamsters with moderately elevated plasma non-HDL cholesterol concentrations. J Nutr 2004;134:410-15.

Alía M, Horcajo C, Bravo L, Goya L. Effect of grape antioxidant dietary fiber on the total antioxidant capacity and the activity of liver antioxidant enzymes in rats. Nutr Res 2003;23:1251-67.

Anderson JW. Cholesterol - lowering effects of soluble fiber in human. In: Kritchevsky D e Bonfield C. (Eds.). *Dietary Fiber in Healthy and Disease*. St. Paul: Eagar Press, 1995a. p.126-145.

Anderson JW. Dietary fibre, complex carbohydrate and coronary heart disease. Can J Cardiol 1995b;11:55G-62G.

Anderson JW, Baird P, Davis Jr RH, et al. Health benefits of dietary fiber. Nutr Rev 2009;67:188-205.

Aouadi R, Aouidet A, Elkadhi A, Ben Rayana C, Jaafoura H, Tritar B, Nagati K. Effect of fresh garlic (*Allium sativum*) on lipid metabolism in male rats. Nutr Res 2000;20(2):273-80.

Banerjee SK, Maulik M, Mancahanda SC, Dinda AK, Gupta SK, Maulik SK. Dose-dependent induction of endogenous antioxidants in rat heart by chronic administration of garlic. Life Sc 2002;70:1509-18.

Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976;72:248-54.

BRASIL. Ministério da Saúde. A vigilância, o controle e a prevenção das doenças crônicas não-transmissíveis: DCNT no contexto do Sistema Único de Saúde brasileiro/ Brasil. Ministério da Saúde – Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde, 2005.

* De acordo com as normas do Guia de Apresentação de Teses. Biblioteca/CIR – Centro de Informação e referência em Saúde Pública. 2 ed. São Paulo; 2006.

Bursill C, Roach PD, Bottema CD, Pal S. Green tea upregulates the low-density lipoprotein receptor through the sterol-regulated element binding protein in HepG2 liver cells. *J Agric Food Chem* 2001;49(11):5639-45.

Cao G, Alessio HM, Cutler RG. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Rad Biol Med* 1993;14(3): 303-311.

Chen HW, Tsai CW, Yang JJ, Liu CT, Kuo WW, Lii CK. The combined effects of garlic oil and fish oil on the hepatic antioxidant and drug-metabolizing enzymes of rats. *The British J Nutr* 2003;89:189-200.

Chen Z-Y, Jiao R, Ma KY. Cholesterol-Lowering Nutraceuticals and Functional Foods. *J Agri. Food Che.* 2008;56:8761-73.

Demetrius PA. Efeitos biológicos o consumo de chá-mate (*Ilex Paraguariensis*) frente à obesidade em camundongos. São Paulo, 2009. [Dissertação de Mestrado-Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo/USP].

Durak I, Aytaç B, Devrim E, Avci A, Erol Ç, Oral D. Effects of garlic extract consumption on plasma and erythrocyte antioxidant parameters in atherosclerotic patients. *Life Sc* 2004;75(16):1959-66.

Ferrari CKB, Torres EAFS. Biochemical pharmacology of functional foods and prevention of chronic diseases of aging. *Biomed Pharmacother* 2003;57:251-60.

Ferrari CKB. Functional foods and physical activities in health promotion of aging people. *Maturitas* 2007;58:327-39

Festa F, Aglitti T, Duranti G, Ricordy R, Perticone P, Cozzi R. Strong antioxidant activity of ellagic acid in mammalian cells in vitro revealed by the comet assay. *Anticancer Res* 2001;21(6A):3903-08.

Flora SJS, Mehta A, Gupta R. Prevention of arsenic-induced hepatic apoptosis concomitant administration of garlic extracts in mice. *Chemico-Biological Interactions* 2009;177:227-33.

Frota KMG, Mendonça S, Saldiva PHN, Cruz RJ, Arêas JAG. Cholesterol-Lowering properties of wole cowpea seed and its pretein in hamsters. *J Food Sc* 2008;73(9):H235-H40.

Gavino VC, Gavino G, Leblanc MJ, Tuchweber B. An isomeric mixture of conjugated linoleic acids but not pure cis-9, trans-11-octadecadienoic acid affects body weight gain and plasma lipids in hamsters. *J Nutr* 2000;130:27-9.

Gebhardt R, Beck H. Differential inhibitory effects of garlic-derived organosulfur compounds on cholesterol biosynthesis in primary rat hepatocyte cultures. *Lipids* 1996;1269-76.

Gorinstein S, Leontowicz H, Leontowicz M, Drzewiecz J, Najman K, Katrich E, Barasch D, Yamamoto K, Trakhtenberg S. Raw and boiled garlic enhances plasma antioxidant activity and improves plasma lipid metabolism in cholesterol-fed rats. *Life Sc* 2006b;78(6):655-63.

Gorinstein S, Leontowicz M, Leontowicz H, Najman K, Namiesnik J, Park Y-S, Jung S-T, Kang S-G, Trakhtenberg S. Supplementation of garlic lowers lipids and increases antioxidant capacity in plasma of rats. *Nut Res* 2006c;26(7):362-68.

Gorinstein S, Leontowicz H, Leontowicz M, Jastrzebski Z, Najman K, Tashma Z, Katrich E, Heo B-G, Cho J-Y, Park Y-J, Trakhtenberg S. The Influence of Raw and Processed Garlic and Onions on Plasma Classical and Non-classical Atherosclerosis Indices: Investigations *In Vitro* and *In Vivo*. *Phytother Res* 2010;24:706-14.

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.

Ishimoto EY. Atividade antioxidante *in vitro* em vinhos e sucos de uva. São Paulo, 2008. [Tese de Doutorado - Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo/USP].

Jastrzebski Z, Leontowicz H, Leontowicz M, Namiesnik J, Zachwieja Z, Barton H, Pawelzik E, Arancibia-Avila P, Toledo F, Gorinstein S. The bioactivity of processed garlic (*Allium sativum* L.) as shown *in vitro* and *in vivo* studies on rats. *Food and Chem Toxicol* 2007;45:1626-33.

Kowala MC, Grove RI, Aberg G. Inhibitors of angiotensin converting enzyme decrease early atherosclerosis in hyperlipidemic hamsters. Fosinopril reduces plasma cholesterol and captopril inhibits macrophage-foam cell accumulation independently of blood pressure and plasma lipids. *Atherosclerosis* 1994;108(1):61-72.

Lanzotti V. The analysis of onion and garlic. *J Chromat* 2006;1112:3-22.

Lissi EA, Cárceres T, Videla LA. Visible chemiluminescence from rat brain homogenates undergoing autoxidation. I. Effect of additives and products accumulation. *Free Radical Biol Med* 1986;2:63-9.

Martinello F, Soares SM, Franco JJ, Santos AC, Sugohara A, Garcia SB, Curti C, Uyemura AS. Hypolipemic and antioxidant activities from *Tamarindus indica* L. pulp fruit extract in hypercholesterolemic hamsters. *Food Chem Toxicol* 2006;44:810-18.

Matsudo V, Matsudo S, Andrade D, Araujo T, Oliveira LCE, Braggion G. Promotion of physical activity in a developing country: The Agita São Paulo experience. *Public Health Nutr* 2002;5:253-61.

Mendonça S, Saldiva PH, Cruz RJ, Arêas JAG. Amaranth protein presents cholesterol-lowering effect. *Food Chem* 2009;116(3):738-42.

Miranda DCD, Arçari DP, Pedrazzoli Jr J, Carvalho PO, Cerutti SM, Bastos DHM, Ribeiro ML. Protective effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on H₂O₂-induced DNA damage and DNA repair in mice. *Mutag* 2008;23(4):261-65.

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

Niki E. Assessment of Antioxidant Capacity *in vitro* and *in vivo*. *Free Rad Biol Med* 2010;49:503-15.

Normén L, Brygelson S, Johnson M, Dutta P. The phytosterols contents some cereal foods commonly consumed in Sweden and in the Netherlands. *J Food Comp Anal* 2002;15:693-704.

Oldham KM, Wise SR, Chen L, Stacewicz-Sapuntzakis M, Burns J, Bowen PE. A longitudinal evaluation of oxidative stress in trauma patients. *J Parenter Enteral Nutr* 2002;26(3):189-97.

Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agric Food Chem* 2001;49:4619-26.

Ou CC, Tsao SM, Lin MC, Yin MC. Protective action on human LDL against oxidation and glycation by four organosulfur compounds derived from garlic. *Lipids* 2003;38(3):219-24.

Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967;70(1):158-69.

Pal S, Ho N, Santos C, Dubois P, Mamo J, Croft K, Allister E. Red wine polyphenolics increase LDL receptor expression and activity and suppress the secretion of ApoB100 from human HepG2 cells. *J Nutr* 2003;133:700-06.

Pari L, Prasath A. Efficacy of caffeic acid in preventing nickel induced oxidative damage in liver of rats. *Chem Biol Interac* 2008;173:77-83.

Pool-Zobel BL, Lotzmann N, Knoll M, Kucheumeister F, Lambertz R, Leucht U, SchOder HG, Schmezer P. Detection of Genotoxic Effects in Human Gastric and Nasal Mucosa Cells Isolated from Biopsy Samples. *Environm Mol Mut* 1994;24:23-45.

Porrini M, Riso P, Brusamolino A, Berti C, Guarnieri S, Visioli F. Daily intake of a formulated tomato drink affects carotenoid plasma and lymphocyte concentrations and improves cellular antioxidant protection. *Br J Nutr* 2005;93(1):93-9.

Queiroz YS, Ishimoto EY, Bastos DHM, Sampaio GR, Torres EAFS. Garlic (*Allium sativum* L.) and ready-to-eat garlic products: *in vitro* antioxidant activity. *Food Chem* 2009;115(1):371-74.

Rahman K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin Interv Aging* 2007;2(2):219-36.

Reeves PG, Nielsen FH, Fahey Jr, GC. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *J Nutr* 1993;123:1939-51.

Reitman S, Frankel S. Colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalocetic and glutamic pyruvic transaminases. *J Am Clin Path* 1957;28:56-63.

Ryan E, McCarty FO, Maguire AR, O'Brien NM. Phytosterol oxidation products: their formation, occurrence, and biological effects. *Food Rev Int* 2009;25:157-74.

Shanmugarajan TS, Krishnakumar E, Somasundaram I, Sivaraman D, Arunsundar M, Balaji R, Sivakumar SM. Salutary effect of ferulic acid against D-galactosamine challenged liver damage. *J Biol Sci* 2008;8(8):1271-79.

Sies H, Stahl W, Sevanian A. Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. *J Nutr* 2005;135:969-72.

Shi YL, James AE, Benzie IF, Buswell JA. Mushroom-derived preparations in the prevention of H₂O₂-induced oxidative damage to cellular DNA. *Teratog Carcinog Mutagen* 2002;22(2):103-11.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988;175:184-91.

Spiteller G. The important role of lipid peroxidation processes in aging and age dependent diseases. *Mol Biotechnol* 2007;37(1):5-12.

Stocks J, Gutteridge JMC, Sharp RJ, Dormandy TL. Assay using brain homogenate for measuring the antioxidant activity of biological fluids. *Clin Sci Mol Med* 1974;47:215-22.

Terpstra AHM, Holmes JC, Nicolosi RJ. The hypercholesterolemic effect of dietary soybean protein vs. casein in hamsters fed cholesterol-free or cholesterol-enriched semipurified diets. *J Nutr* 1991;121:944-47.

Utesch D, Feige K, Dasenbrock J, Broschard TH, Harwood M, Danielewska-Nikiel B, Lines TC. Evaluation of the potential *in vivo* genotoxicity of quercetin. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 2008;654:38-44.

Vicente SJV. Caracterização antioxidante do café (*Coffea Arabica*, L) e efeitos da sua administração oral em ratos. São Paulo, 2009. [Tese de Doutorado - Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo/USP].

WHO - World Health Organization. Action Plan for the Global Strategy for the Prevention and Control of Noncommunicable Diseases. Geneva, 2008.

WHO – World Health Organization. World Health Statistics 2009. Geneva, 2009.

Willcox, Joye K., Ash, Sarah L. and Catignani, George L. Antioxidants and Prevention of Chronic Disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2004;44(4):275-95.

Woolliams JA, Wiener G, Anderson PH, McMurray CH. Variation in the activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase and in the concentration of copper in the blood of various breed crosses of sheep. *Res Vet Sci* 1983;34:253-56.

Wu CC, Sheen LY, Chen H-W, Tsai S-J, Lii C-K. Effects of organosulfur compounds from garlic oil on the antioxidant system in rat liver and red blood cells. *Food and Chem Toxicol* 2001;39:563-69.

Zern TL, West KL, Fernandez ML. Grape polyphenols decrease plasma triglycerides and cholesterol accumulation in the aorta of ovariectomized guinea pigs. *J Nutr* 2003;133:2268-72.

ANEXO 1- Aspecto Ético / Faculdade de Saúde Pública

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO - Laboratório de Bromatologia
Av. Dr. Arnaldo, 715 - Cerqueira César
CEP: 01246-904 São Paulo/SP
Tel.: (011) 3061-7705, 01, 71, 36 R: 230
Fax.: (011) 3061-6748 R: 233
eatortes@usp.br www.fsp.usp.br/~eatortes/

São Paulo, 16 de julho de 2007.

DECLARAÇÃO

Eu, Yara Severino de Queiroz, aluna de doutorado regularmente matriculada no programa de Nutrição em Saúde Pública do Departamento de Nutrição da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo sob no 1.766.880, declaro que o Projeto de Doutorado intitulado "Efeito dos compostos bioativos do alho (*Allium sativum* L.) cru e processado sob a capacidade antioxidante *in vivo*" não irá utilizar voluntários humanos em nenhuma das suas etapas, sendo desnecessária a sua submissão ao Comitê de Ética desta faculdade, conforme informado pelo COEP/FSP/USP.

Estamos à disposição para qualquer esclarecimento que se faça necessário.

Atenciosamente,

Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva Torres
Prof. Assoc. Departamento de Nutrição FSP/USP

Yara Severino de Queiroz
Aluna de Doutorado

RECEBIDO
ASSINATURA:
DATA: 17/07/07

ANEXO 2 - Aspectos Ambientais**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – COEP/FSP**Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

Of.COEP/ 189 / 08

Protocolo 1810

Projeto de Pesquisa EFEITO DO PROCESSAMENTO DO ALHO (ALLIUM SATIVUM L.) SOBRE OS SEUS COMPOSTOS BIOATIVOS E POTENCIAL ANTIOXIDANTE IN VITRO E IN VIVO

Pesquisador(a) Yara Severino de Queiroz

11 de JULHO de 2008.

Prezado(a) Orientador(a),

O Sub-Comitê de Ética Ambiental da Faculdade de Saúde Pública analisou as informações quanto aos resíduos químicos a serem gerados durante a execução do projeto de sob responsabilidade de V.S.^a acima intitulado.

Cabe informar que a Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo possui desde 10 de novembro de 2004, "Certificado de Aprovação para o Destino de Resíduos Industriais", sob n.º 45001604, expedido pela CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental), específico para o destino de "reagentes de laboratórios" que tem como procedimento padrão a contratação de empresa licenciada para o transporte e incineração desses resíduos.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública em sua 6.ª/08 Sessão Ordinária, realizada em 04.07.08, considerou o protocolo de pesquisa **APROVADO**.

Atenciosamente,

Cláudio Leone

Professor Associado

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa – FSP/COEP

Ilm.º Sr.º
Prof.ª Dr.ª ELIZABETH APARECIDA FERRAZ DA SILVA TORRES
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO

ANEXO 3 – Reagentes e equipamentos

Foram utilizados os seguintes reagentes para as análises abaixo:

- Composição proximal:

- 1) Proteínas - ácido sulfúrico P.A. (Dinâmica Reagentes para Laboratório), hidróxido de sódio P.A., ácido bórico P.A., ácido clorídrico P.A e vermelho de metila e azul de metileno (Labsynth Produtos para Laboratório LTDA), sulfato de cobre P.A. e sulfato de potássio P.A (Merck KgaA, Alemanha);
- 2) Lipídios - clorofórmio P.A., metanol P.A. e sulfato de sódio (CAAL Produtos Químicos Ltda);
- 3) Fibras – tampão MES/TRIS, amiloglicosidase, α -amilase e protease (Sigma-Aldrich Co., EUA.); etanol P.A. (CAAL Produtos Químicos Ltda); lâ de vidro e detergente neutro (Merck KgaA, Alemanha); ácido clorídrico P.A. (Labsynth Produtos para Laboratório LTDA).

- Perfil de ácidos graxos:

Padrão Lipid Standard - Fatty acid methyl ester mixture # 189-19 (Sigma-Aldrich Co., EUA); trifluoreto de boro-metanol – BF_3 (Merck KgaA, Alemanha); hexano P.A., hidróxido de potássio P.A., etanol P.A. (Dinâmica Reagentes para Laboratório).

- Minerais:

- 1) selênio - padrão multielementar rastreável, ácido nítrico grau HPLC, ácido clorídrico grau HPLC e peróxido de hidrogênio (Merck KgaA, Alemanha);
- 2) cobre - padrão Titrisol CuCl_2 (cloreto cúprico), peróxido de hidrogênio e ácido nítrico grau HPLC (Merck KgaA, Alemanha);
- 3) zinco - padrão Titrisol o ZnCl_2 (clorato de zinco), peróxido de hidrogênio e ácido nítrico (Merck KGaA – Alemanha).

- Extratos:

Etanol P.A., metanol P.A. e acetona P.A. (CAAL Produtos Químicos Ltda).

- Compostos fenólicos totais:

Reagente de Folin-Ciocalteu e ácido gálico (Sigma-Aldrich Co., EUA); carbonato de sódio (Synth- Labsynth produtos para laboratórios Ltda).

- Compostos fenólicos por HPLC:

TBHQ (tert-butilidroquinona), padrões quercetina, apigenina e miricetina (Sigma-Aldrich Co., EUA); metanol grau HPLC e ácido acético grau HPLC (Merck KgaA, Alemanha); ácido clorídrico P.A (Labsynth Produtos para Laboratório LTDA).

- Alicina:

Ácido pirúvico e 2,4-dinitrofenilidrazina – DNPH (Sigma-Aldrich Co., EUA), ácido clorídrico P.A. e hidróxido de sódio P.A. (Labsynth Produtos para Laboratório LTDA).

- Fitosteróis:

Etanol P.A. e hexano P.A. (CAAL Produtos Químicos Ltda); hidróxido de potássio P.A. (Labsynth Produtos para Laboratório LTDA); tri-sil e padrões Campesterol, Stigmasterol e β -sitosterol (Sigma-Aldrich Co., EUA).

- Produtos intermediários da reação de Maillard:

Sulfato de quinina (Sigma-Aldrich Co. – EUA); carrez I e II (Labsynth produtos para laboratórios Ltda).

- Teste ORAC:

AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropano), fluoresceína (3',6'-diidroxiespiro[isobenzofurano-1[3H],9'[9H]-xanten-3-ona) e Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) (Sigma-Aldrich Co., EUA).

- Sistema β -caroteno/ácido linoléico:

Clorofórmio P.A. (CAAL Produtos Químicos Ltda); Tween 40 (Merck KgaA, Alemanha); ácido gálico, ácido linoléico e β -caroteno (Sigma-Aldrich Co., EUA).

- Teste Rancimat[®]:

Gordura vegetal hidrogenada (marca Sadia[®]).

- Proteínas totais do tecido hepático:

Reagente de Bradford e albumina bovina sérica (BSA) (Sigma-Aldrich Co. - EUA).

- Atividade das enzimas superóxido dismutase e glutaciona peroxidase:

Kits Ransod[®] e Ransel[®], respectivamente (Randox Laboratories Ltd. - Reino Unido). Para a determinação da atividade da enzima catalase, foram utilizados

peridrol (H₂O₂) 30% (Merck KgaA - Alemanha), tampão Trisma-HCl (Sigma Aldrich – EUA) e Na₂EDTA (Labsynth Ltda - Brasil).

- Biomarcadores hepáticos:

Kits AST/TGO Liquiform e ALT/TGP Liquiform (Labtest Diagnóstica S.A. - Brasil).

- Colesterol total, frações de colesterol (HDL-c, LDL-c e VLDL-c) e triacilgliceróis:

Determinados por *kits* de reagentes (Roche Diagnostic[®]).

- Ensaio Cometa:

HISTOPAQUE-1077, solução de PBS, cloreto de sódio, EDTA, Tris, SDS, Triton X-100, DMSO, hidróxido de sódio (Sigma-Aldrich Co - USA), solução de Hank's HBSS, corante *SYBR Safe*TM (Invitrogen, Carsbad, CA - USA).

Equipamentos utilizados:

- Agitador de tubos marca Phoenix Ind. E Com. Equipamentos Científicos, modelo AP-56, Brasil;

- Estufa marca Quimis Aparelhos Científicos LTDA, Brasil;

- Cromatógrafo a gás marca “Shimadzu, CG-2010”, equipado com: 1) coluna capilar SP 2560 da SUPELCO (100 m x 0,25 mm x 0,2 µm) para análise de perfil lipídico e 2) coluna Factor Four, 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm, Varian, USA para determinação dos fitosteróis;

- Agitador magnético marca Quimis, modelo Q.261.2, Brasil;

- Centrífuga marca Sigma, modelo 3-18k, Germany;

- Espectrofotômetro de fluorescência Perkin Elmer modelo FL-55, EUA, com cubetas de quartzo com um caminho óptico de 1cm;

- Homogeneizador UltraTurrax TDS1 fabricado pela IKA Works Inc. - EUA;

- Espectrofotômetro UV-VIS modelo UV-1650 da Shimadzu – Japão com célula de quartzo de 10 mm termostaticada;

- Deionizador de água EASYpure RF da Barnstead Thermolyne - EUA;

- Rotaevaporador marca Büchi, modelo 461, Switzerland;

- Processador Walita, modelo R17115 – Brasil;

-Mufla marca Quimis Aparelhos Científicos LTDA, modelo Q. 318.24, Brasil;

- Espectrômetro de emissão com fonte de plasma com acoplamento indutivo (ICP OES) simultâneo, Varian, modelo MPX (Mulgrave Victoria, Austrália);

- Espectrofotômetro de absorção atômica Analyst 100, Perkin Elmer, EUA;

- Ultrassonificador marca Thornton, modelo 1400, Brasil;

- Cromatógrafo líquido (HPLC) da marca TSP (THERMO SEPARATION PRODUCTS) composto de: 1) Bomba (SpectraSystem e Spectra Series Gradient Pumps); 2) Degazeificador (SCM Vaccum Membrane Degasser); 3) Detector UV/VIS (SpectraSystem UV/VIS Detectors); 4) Injetor Automático (SpectraSystem e Spectra Series Autosamplers); Interface SN4000 (SpectraSystem). A coluna utilizada foi a C18 (3,9x150 mm; 4- μ m particle) da Varian.

- Aparelho Rancimat[®] 743, marca Metrohm, conectado ao programa PC: 743 Rancimat 1.0;

- Liofilizador marca Liobrás, modelo LP 620, Brasil;

- Moedor marca Cadence, modelo MDR301.

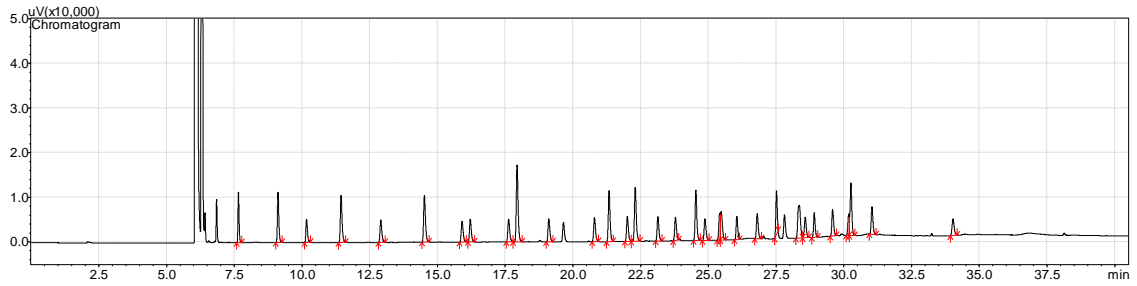
- Ultracentrífuga modelo WXUltra90 e ultrafreezer modelo ULT-1386 fabricados pela Thermo Electron Corporation - EUA;

- Microscópio de fluorescência Nikon, modelo E2600 - Japan;

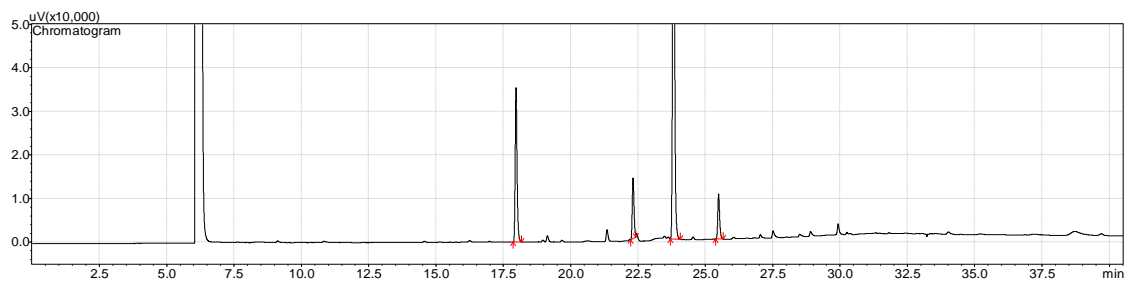
- Analisador bioquímico modelo Modular P 800, marca Roche Diagnostic[®] - Suíça).

ANEXO 4 - Cromatograma do perfil de ácidos graxos do padrão e das amostras de alho liofilizadas

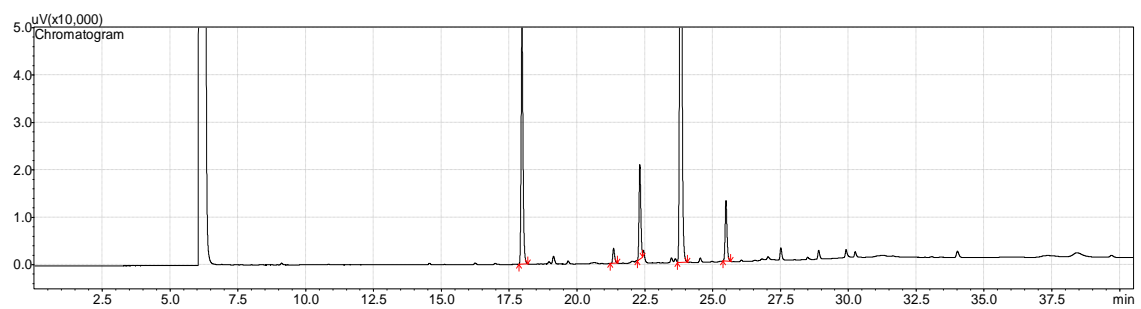
Cromatograma padrão de ácidos graxos.



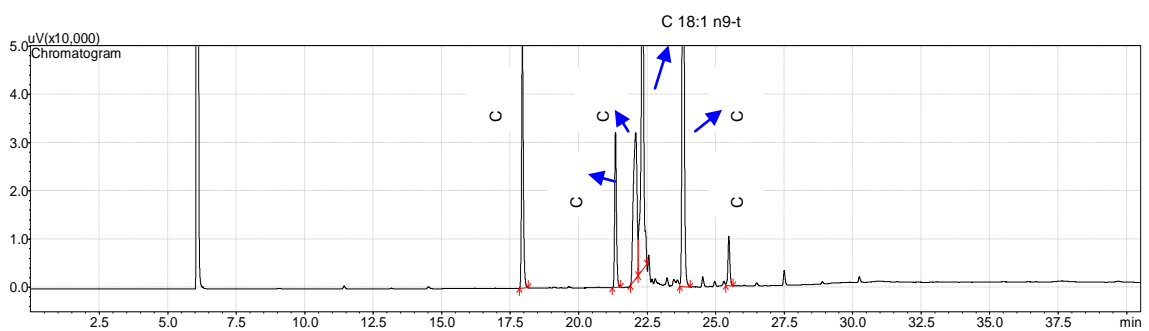
Cromatograma de análise de ácidos graxos do alho cru.



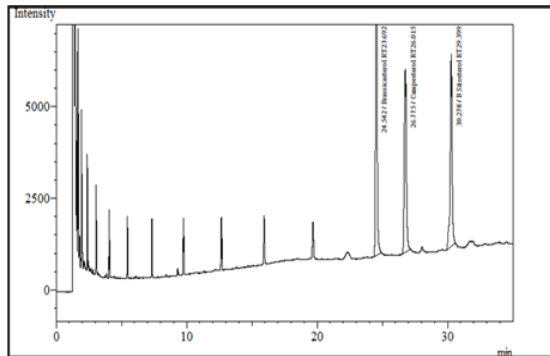
Cromatograma de análise de ácidos graxos do alho cozido.



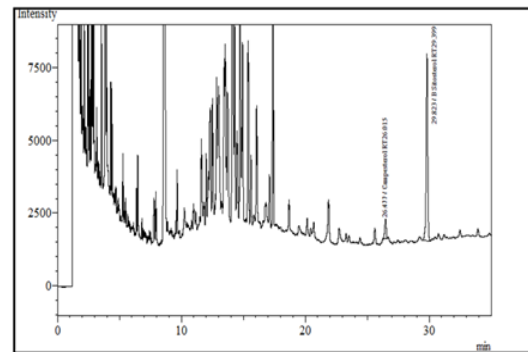
Cromatograma de análise de ácidos graxos do alho frito.



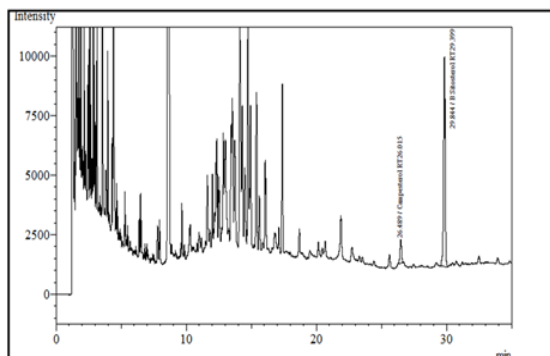
ANEXO 5 - Cromatograma do padrão de fitosteróis e das amostras de alho liofilizadas



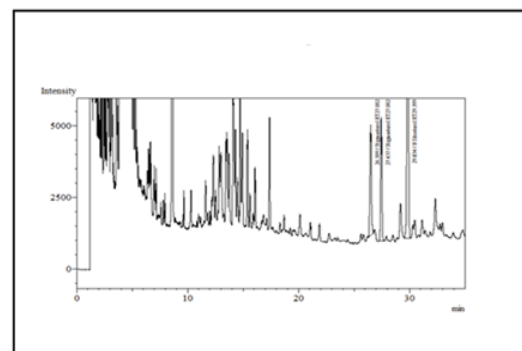
Padrão de fitosteróis



Alho cru



Alho cozido



Alho frito

ANEXO 6 - Aspecto Ético / IMT – Faculdade de Medicina Tropical/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil
Telefone:(55-11)3061-7066 e 3064-5132 FAX: (55-11) 3064-5132 e 3062-2174



São Paulo, 09 de abril de 2008.

Ilma. Sra.

Profa. Dra. Elisabeth Aparecida Ferraz da Silva Torres



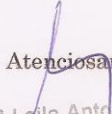
Prezado Senhor:

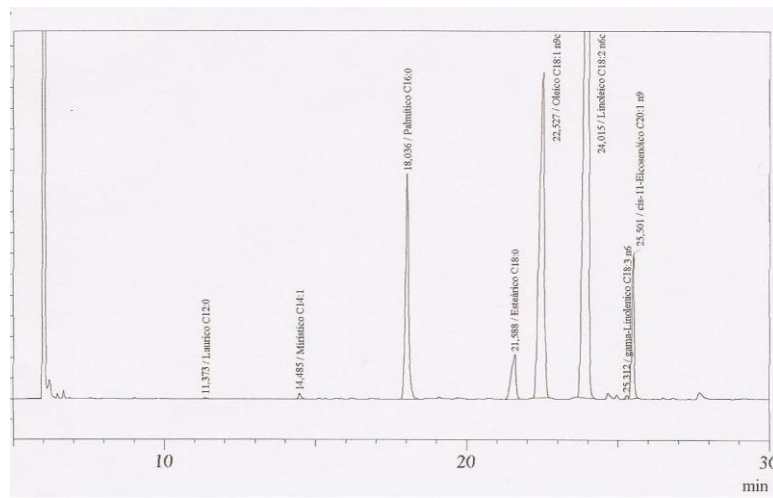
Em reunião na presente data o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo analisou e **aprovou**, no que diz respeito aos aspectos de natureza ética, o projeto de pesquisa, classificado sob número 005/08 e intitulado “**Efeito do processamento do alho (*Allium sativum* L.) sobre os seus compostos bioativos e potencial antioxidante *in vitro* e *in vivo***”, encaminhado pela pós-graduanda **Yara Severino de Queiroz**, orientada por Vossa Senhoria.

Atenciosamente

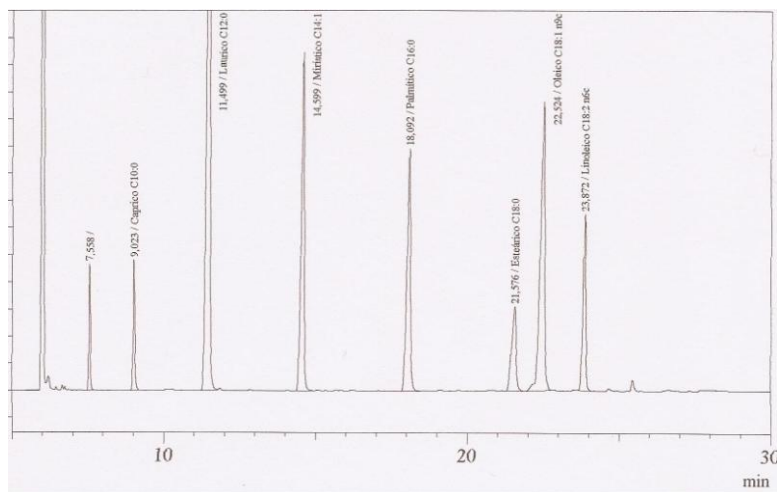
Prof. Dr. Pedro Paulo Chieffi
Coordenador do CEP-IMT

ANEXO 7 - Protocolo – Comissão de Ensino e Pesquisa - HC/FMUSP

	INSTITUTO CENTRAL HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO Av. Dr. ENÉAS DE CARVALHO AGUIAR, 255 CEP 05403-900 SÃO PAULO - BRASIL	
São Paulo, 29 de Agosto de 2008.		
ILMA(s). Sra(s). Prof. Dr.ª Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva Torres e Dra. Yara Severino de Queiroz Depto. De Nutrição da Faculdade de Saúde Pública da USP		
Referência: Projeto de Pesquisa: LACE <p style="text-align: center;">PR 539 “Efeito do processamento do alho (<i>allium sativum</i> L.) sobre os seus compostos bioativos e potencial antioxidante <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>”.</p> A Comissão de Ensino e Pesquisa da Divisão de Laboratório Central considerou exequível a realização da coleta de laboratório relacionados ao seu projeto de pesquisa. Informamos que V.s.a. poderá iniciá-lo conforme seu Cronograma, sendo que os pedidos de exames deverão ser preenchidos conforme modelo abaixo, a fim de evitarmos desvios nos resultados. É FUNDAMENTAL QUE V.S.a PROVIDENCIE UM CARIMBO PARA IDENTIFICAÇÃO DE SEU PROTOCOLO, conforme: <u>PR-539</u> CARIMBADO EM TODOS OS PEDIDOS DE EXAME, DE PREFERÊNCIA, COM TINTA VERMELHA.		
No campo CLÍNICA: preencher com a palavra LACE No campo PESQUISA PR 539 Com carimbo vermelho: PR 539		
Qualquer dúvida ou necessidade de esclarecimentos, contactar Prof.ª Leila Antonangelo, relatora do projeto, no telefone 3069-6158.		
Nº total de pacientes no projeto: aproximadamente 80 animais – encaminhamento de 20 amostras mensais – 01 determinação/animal.		
COLESTEROL HDL LDL VLDL TRIGLICÉRIDES		
<u>C/C</u>		
BIOQUIMICA	SERVIÇO AUXILIAR	CADASTRO
		EXP. DE LAUDOS
Atenciosamente,  Prof.ª, Dr.ª Leila Antonangelo <small>Coordenadora do Serviço de Ensino e Pesquisa</small>		

ANEXO 8 - Cromatograma do perfil de ácidos graxos das rações

Ração controle



Ração hipercolesterolêmica

CURRÍCULO LATTES – Yara Severino de Queiroz

Yara Severino de Queiroz

Possui graduação em Nutrição pela Universidade Federal de Ouro Preto (2000), especialização em Nutrição Humana e Saúde pela Universidade Federal de Lavras (2004) e mestrado em Saúde Pública pela Universidade de São Paulo (2006). Tem experiência na área de Saúde Coletiva, com ênfase em Saúde Pública, atuando principalmente nos seguintes temas: atividade antioxidante, alho, cafeína, substitutos de gordura, raízes, yerba maté e xantonas.

(Texto informado pelo autor)

Última atualização do currículo em 05/07/2010

Endereço para acessar este CV:

<http://lattes.cnpq.br/6096381205039163>

Dados pessoais

Nome Yara Severino de Queiroz

Nome em citações bibliográficas QUEIROZ, Y. S.

Sexo Feminino

Formação acadêmica/Titulação

- 2007** Doutorado em andamento em Nutrição em Saúde Pública. Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: Efeito do processamento do alho (*Allium sativum* L.) sobre seus compostos bioativo e potencial antioxidante *in vitro* e *in vivo*.
Orientador: Elizabeth A F S Torres.
Palavras-chave: alho; processamento térmico; compostos bioativos; potencial antioxidante; enzimas antioxidantes.
- 2004 - 2006** Mestrado em Saúde Pública (Conceito CAPES 5) . Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: Alho (*Allium sativum*) e produtos: Atividade antioxidante *in vitro* no decorrer da vida de prateleira, *Ano de Obtenção:* 2006.
Orientador: Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva Torres.
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
Palavras-chave: oxidação lipídica; alho; produtos de alho; vida de prateleira; atividade antioxidante.
Grande área: Ciências da Saúde / *Área:* Saúde Coletiva / *Subárea:* Saúde Pública.
Setores de atividade: Nutrição e Alimentação.
- 2003 - 2004** Especialização em Nutrição Humana e Saúde . (Carga Horária: 555h). Universidade Federal de Lavras, UFLA, Brasil.
Título: Alimentos funcionais e principais ações no organismo.
Orientador: Michel de Angelis.
- 1996 - 2000** Graduação em Nutrição. Universidade Federal de Ouro Preto, UFOP

CURRÍCULO LATTES – Elizabeth A. F. S. Torres



Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva Torres

Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq - Nível 2

Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva Torres concluiu o Doutorado em Ciência dos Alimentos (São Paulo, SP) pela Universidade de São Paulo, em 1988. Foi Visiting Scholar na MSU de 1986 a 1987, como bolsista Fulbright Commission. Professora Associada - desde 2000 na Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. Publicou 83 artigos em periódicos especializados e 126 trabalhos em anais de eventos. Possui 4 livros publicados, 1 processo, 1 software e 1 patente técnica além de outros 30 itens de produção técnica. Participou de 11 eventos no exterior e 78 no Brasil. Supervisionou 1 pós-doutor com bolsa da FAPESP e supervisiona um Jovem Pesquisador com auxílio e bolsa da FAPESP. Orientou 22 dissertações de Mestrado, 11 teses de Doutorado e co-orientou 1 tese de Doutorado, em complemento orientou 22 trabalhos de Iniciação Científica nas áreas de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Nutrição e Saúde Coletiva. Recebeu 6 Prêmios/Homenagens. Atua diretamente na área de Ciência e Tecnologia de Alimentos com ênfase em quatro linhas de pesquisa: 1) Lipídios, ácidos graxos, colesterol, fitoesterol e seus produtos de oxidação. 2) Antioxidantes e substâncias bioativas. 3) Carnes, Aves e Pescados 4) Microssomos, Lipossomos e Sistemas Modelo. Em suas atividades profissionais, interagiu com 165 colaboradores em co-autorias de trabalhos científicos. Em seu CVLattes, os termos mais frequentes na contextualização da produção científica, tecnológica e artístico cultural, são: aulas ministradas, comissões, grupos de trabalho, valor nutricional, segurança alimentar, lipídios, qualidade higiênico sanitária, substitutos de gordura, alimentos funcionais e tecnologia de alimentos. Em 09/09/2010 apresentou fator H=8 na base SCOPUS.

(Texto informado pelo autor)

Última atualização do currículo em 09/09/2010

Endereço para acessar este CV:

<http://lattes.cnpq.br/9804923403746874>

Dados pessoais

Nome Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva Torres

Nome em citações bibliográficas TORRES, E. A. F. S.;

Sexo Feminino

Endereço profissional Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, Departamento de Nutrição.
Av. Dr. Arnaldo, 715 HNT
Cerqueira César
01246-904 - Sao Paulo, SP - Brasil
Telefone: (11) 30617857 Fax: (11) 30617130
URL da Homepage: www.fsp.usp.br/~eatorres/

Formação acadêmica/Titulação

2000 Livre-docência.
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: Teor de Lipídios em Alimentos e sua importância na Nutrição, *Ano de obtenção:* 2000.
Palavras-chave: CSI; dieta aterogênica; teor de lipídios; Índice de Colesterol; PCA.
Grande área: Ciências Agrárias / *Área:* Ciência e Tecnologia de Alimentos / *Subárea:* Ciência de Alimentos / *Especialidade:* Valor Nutritivo de Alimentos.
Setores de atividade: Nutrição e Alimentação.